Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. dent. Jürgen Becker

Reaktion des Knochengewebes in Tibiadefekten auf eine ölige Calciumhydroxid-Suspension – eine experimentelle Studie an Minischweinen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marco Hartwig Bertrams

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Frank Schwarz

Zweitgutacher/in: Prof. Dr. med. dent. Benedict Wilmes

Meinen Eltern gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Journal of Craniomaxillofacial Surgery 2014 March 10:

Mihatovic I, Payer M, Bertrams M, Vasiliu D, Schwarz F, Becker J, Stratul SI:

Bone tissue response to an oily calcium hydroxide suspension in tibial defects. An experimental pilot study in minipigs.

PMID: 24972865

Abstract

Objectives: The present study was conducted to evaluate the bone tissue response after the application of an oily calcium hydroxide suspension (OCHS) into defects created in the tibial bone of minipigs.

Materials and methods: Standardized defects (2 ccm) were created into the tibia of 4 Goettinger minipigs. Defects in the test group (*n* = 4) were filled with OCHS (Osteora, DFS-Diamon, Riedenburg, Germany). Defects in the control group (*n* = 4) were filled with venous blood. Animals were sacrificed after healing periods of 4 and 8 weeks. Tibias were dissected, soft tissues removed and processed for histological analysis. Digital images (×200) were evaluated using the software CellD (Soft Imaging System, Münster, Germany). The following histomorphometrical landmarks were identified: defect size, mineralized tissue, non-mineralized tissue and residual OCHS.

Results: Healing was uneventful in all four animals. In the test group, new bone formation was observed in the vicinity of the defect margins whereas the centre of the defect was dominated by non-mineralized tissue. Mean percentages of mineralized tissue after 4 weeks were 23.01% in the test group vs. 43.45% in the control group. The mean value for residual OCHS was 7,11% at 4 weeks. After 8 weeks mean percentages of mineralized tissue were 28.15% in the test group vs. 44.39% in the control group as well as 7.05% for residual OCHS.

Conclusion: Within the limits of the present pilot study it can be concluded that OCHS did not have a beneficial effect on new bone formation. To prove an osteoinductive potential of OCHS further studies based on a higher number of samples are needed.

Zusammenfassung

Ziele: Die vorliegende Studie wurde zur Bewertung der Knochenbildung in Defekten der Tibia von Minischweinen nach Applikation einer öligen Calciumhydroxid Suspension (OCHS) durchgeführt.

Material und Methoden: Es wurde ein standardisierter Defekt (2x1,5 cm) in das Knochenmark der Tibiae von 4 Minischweinen geschaffen. Die Defekte der Testgruppe (2 Minischweine) wurden mit OCHS (Osteora, DFS-Diamon, Riedenburg, Deutschland) aufgefüllt, die Defekte der Knotrollgruppe mit Eigenblut. Die Tiere wurden nach Heilungsperioden von 4 und 8 Wochen geopfert. Die Tibiae wurden herauspräpariert, das Weichgewebe entfernt und zur histologischen Untersuchung weiterverarbeitet. Die digitalen Bilder (x200) wurden mit der Software CellD (Soft Imaging System,Munster, Deutschland) beurteilt. Folgende histomorphometrischen Strukturen wurden untersucht: Defektgröße, mineralisiertes und nicht-mineralisiertes Gewebe, sowie Reste von OCHS.

Ergebnisse: Die Heilung verlief bei allen vier Tieren ohne Komplikationen. In der Testgruppe konnte die Bildung neuen Knochens in der Umgebung der Defektränder beobachtet werden, während das Zentrum des Defektes von nicht-mineralisiertem Gewebe dominiert wurde. Der durchschnittliche Anteil von mineralisiertem Gewebe betrug nach 4 Wochen 23,01% in der Testgruppe und 43,45% in der Kontrollgruppe. Der Durchschnittswert für Reste von OCHS lag bei 7,11% nach 4 Wochen. Nach 8 Wochen lag der durchschnittliche Anteil von mineralisiertem Gewebe bei 28,15% in der Testgruppe und 44,39% in der Kontrollgruppe. Der prozentuale Anteil von OCHS-Resten lag bei 7,05%.

Schlussfolgerung: Die Applikation von OCHS, sowie von Eigenblut führten in diesem Typ des Defektmodells zu einer Knochenbildung. Jedoch sollte aufgrund der geringen Stichprobengröße die Tendenzen dieser Studie in weiteren Studien untersucht werden.

Abkürzungsverzeichnis

α-/β-TCP	alpha-/beta-Tricalciumphosphate
a/bFGF	Acidic/Basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CGF	Cementum-Derived Growth Factor
CH	Calciumhydroxid
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
DFDBA	Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft
EGF	Epidermic Growth Factor
FDBA	Freeze-Dried Bone Allograft
GBR	Guided Bone Regeneration
GDF-5	Growth/Differentiation Factor 5
IGF-I/II	Insulin-like Growth Factor
IL-1/-6/-11	Interleukin-1/-6/-11
OCHS	Oily Calcium Hydroxide Suspension
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDL-Zellen	Parodontalligamentzellen
KEM	Knochenersatzmaterial
NMT	Non-mineralized Tissue
MT	Mineralized Tissue
OGP	Osteogenic Growth Peptide
PTHrP	Parathyroid Hormone-Related Protein
SD	Standard Deviation
ROI	Range of Interest
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **6**

Inhaltsverzeichnis **7**

1. Einleitung **9**
1.1 Zusammenfassung **9**
1.2 Hypothese **9**
1.3 Zielsetzung **10**

2 Knochengewebe **11**
2.1 Zusammensetzung von Knochengewebe **11**
2.2 Knochenzellen **11**
2.2.1 Osteoblasten 11
2.2.2 Osteozyten 12
2.2.3 Endostale Saumzellen 12
2.2.4 Osteoklasten 12
2.3 Wachstumsfaktoren **13**
2.4 Hüllstrukturen des Knochens **13**
2.5 Feinbau des Knochens **14**
2.6 Embryonale Entwicklung **15**
2.6.1 Desmale/Membranäre (direkte) Ossifikation 15
2.6.2 Chondrale (indirekte) Ossifikation 15
2.7 Knochendefektheilung **16**
2.7.1 Primäre Frakturheilung 16
2.7.2 Sekundäre Frakturheilung 17

3 Knochenersatzmaterialien **18**
3.1 Transplantationsterminologie **18**
3.2 Ideale Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien **18**
3.3 Transplantatlager **20**
3.4 Knochenersatzmaterialien **21**
3.4.1 Autologe (autogene) Knochentransplantate 21
3.4.2 Allogene Knochentransplantate 22
3.4.3 Xenogene Knochentransplantationen 23
3.4.4 Alloplastische Knochenersatzmaterialien 24

4 Knochenaufbaumethoden **26**
4.1 Geführte Knochenregeneration **26**
4.2 Distraktionsosteogenese **27**
4.3 Tissue Engineering **28**

5 Ölige Calciumhydroxid-Suspension **29**

6 Material und Methoden 31
6.1 Allgemeines 31
6.2 Das Göttinger Minischwein als Versuchsschwein 32
6.2 Chirurgisches Procedere 33
6.3 Abbildungen 34
6.4 Tötung der Tiere und Probengewinnung 36
6.5 Probenaufbereitung 37
6.5.1 Schritt 1 - Technovit 9100 Einbettung 37
6.5.2 Schritt 2 - Trimmen unter Wasserzufuhr 39
6.5.3 Schritt 3 – Schnitte auf Kunststoff Objektträger kleben und Grinden (Schleifen) 39
6.5.4 Schritt 5 - Aufbringen auf silanisierte Objektträger 39
6.5.5 Schritt 4 – Sägen 39
6.5.7 Schritt 6 - Immunhistochemische Anfärbung 40
Vor der immunhistochemischen Anfärbung werden die Proben getrocknet 40
6.6 Histomorphometrische Analyse 40
7 Ergebnisse 41
7.1 Klinische Heilungsphase 41
7.2 Histologische Evaluation 41
7.2.1 Histologische Evaluation nach 4 Wochen 41
7.2.2 Histologische Evaluation nach 8 Wochen 44
7.2.3 Vergleich 4 und 8 Wochen nach histologischer Evaluation 47
8 Diskussion 52
9 Literaturverzeichnis 59
10 Abbildungsverzeichnis 66
11 Tabellenverzeichnis 67

1. Einleitung

1.1 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie entstand in Zusammenarbeit mit der Victor Babeș Universität für Medizin und Pharmazie Timişoara (Rumänien) und der Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Ziel war es, die Reaktion von Knochengewebe auf eine ölige Calciumhydroxid-Suspension (OCHS) in einem geschlossenen Tiermodell zu untersuchen mit dem Fokus auf den Prozessen der Resorption und Knochenneubildung.

Die Wahl des Versuchstieres fiel auf das Göttinger Minischwein. Dieses zeigt in der Makro- und Mikrostruktur des Knochenaufbaus sowie Knochenzusammensetzung und Knochengeweberemodellierung eine große Ähnlichkeit zu humanem Knochen [1]. Bei insgesamt 4 Minischweinen wurde ein standardisierter Defekt (2x1,5cm) in das Knochenmark der Tibiae geschaffen. Die Defekte der Testgruppe wurden mit OCHS (Osteora, DFS-Diamon, Riedenburg, Deutschland) aufgefüllt, die Defekte der Knotrollgruppe mit venösem Eigenblut. Die Tiere wurden nach Heilungsperioden von 4 und 8 Wochen getötet. Die Tibiae wurden herauspräpariert und das Weichteilgewebe entfernt. Die Aufarbeitung der Präparate und die histomorphometrische Auswertung erfolgte durch den Doktoranden an der Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Die digitalen Bilder (x200) wurden mit der Software CellD (Soft Imaging System, Munster, Deutschland) beurteilt. Als histomorphometrischen Parameter wurden Defektgröße, mineralisiertes und nicht-mineralisiertes Gewebe, sowie Residuen von OCHS untersucht.

1.2 Hypothese

Die Regeneration von Knochendefekten durch Traumata, Tumoren oder Entzündungen stellt die Medizin immer wieder vor große Herausforderungen. Die Transplantation von autogenen, allogenen oder alloplastischen Knochenersatzmaterialien sowie die Distraktionsosteogenese sind hierbei routinemäßig verwendete Techniken zur Rekonstruktion von Knochendefekten. Jeder dieser Eingriffe hat jedoch spezifische

Einschränkungen in Bezug auf Verfügbarkeit, Immunogenität oder biomechanische Stabilität. Somit ist das Interesse an osteoinduktiven Verfahren zur Stimulation der Knochenneubildung enorm gestiegen. Insbesondere die Applikation morphogenetischer und mitogener Wachstumsfaktoren und deren stimulierende Wirkung auf das lokale Knochenwachstum wurden in verschiedenen Studien untersucht [2, 3]. Allerdings gibt es hier auch Einschränkungen, die eine routinemäßige Umsetzung in die tägliche Praxis verhindern. Folglich besteht weiterhin ein Bedarf nach Alternativen, welche ein zufriedenstellendes Ergebnis der Knochenregeneration ebenso wie den Wunsch des Patienten nach minimal-invasiven Operationsmethoden realisieren können. Ein vielversprechender Ansatz war vor einigen Jahren die Idee, ölige Calciumhydroxid-Suspension (OCHS) zur Geweberegeneration zu verwenden [4].

1.3 Zielsetzung

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Calciumhydroxid (CH) neben antimikrobiellen [5, 6] und antiinflammatorischen Eigenschaften [7] auch positive Effekte auf periapikale und parodontale Defekte besitzt [8-12]. Jedoch sind die Erkenntnisse im Hinblick auf die knochenregenerativen Eigenschaften eher gering und nicht unumstritten [13, 14]. Dennoch konnten In-vitro-Daten zeigen, dass eine ölige Calciumhydroxid-Suspension (OCHS) einen stimulierenden Effekt auf Zellwachstum, Differenzierung und Metabolismus von Progenitorzellen hat [15]. Bis jetzt wurde die Wirkung von CH auf die Knochenregeneration in offenen Modellen [16] oder bei externer Applikation mit GBR-Techniken untersucht [13, 14]. Ziel dieser Arbeit war es, die Reaktion von Knochengewebe auf eine ölige Calciumhydroxid-Suspension in einem geschlossenen Tiermodell zu untersuchen. Der Fokus lag dabei besonders auf den Prozessen der Resorption und Knochenneubildung.

2 Knochengewebe

2.1 Zusammensetzung von Knochengewebe

Knochengewebe besteht aus einer spezialisierten Bindegewebsmatrix, die zu 70% anorganische (mineralische) und 30% organische Substanzen enthält. Die anorganische feste Komponente besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatitkristallen ($Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$), geringen Mengen von Kalziumcarbonat ($CaCO_3$) und amorphem Kalziumhydrogenphosphat ($CaHPO_4$) sowie einer Vielzahl von Anionen (u.a. Zitrat, Fluorid) und Kationen (u.a. Magnesium, Eisen, Zink, Kupfer, Strontium, Blei). Der organische Anteil der Knochenmatrix besteht zu 90% aus Kollagen Typ I und zu 10% aus anderen Matrixproteinen, welche sich wie folgt zusammensetzen: Kollagen Typ V (5%), Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein (20%), Osteonectin (20%), Osteopontin, Bone-Sialopontin und Thrombospondin (zusammen ca. 20%), Proteoglykanen (Biglycan, Decorin: ca. 5%) sowie Fibronectin, Serumalbumin und weitere Komponenten [17].

2.2 Knochenzellen

Die spezifischen Zellen des Knochengewebes sind Osteoblasten, Osteozyten, endostale Saumzellen und Osteoklasten.

2.2.1 Osteoblasten

Die Synthese und Sezernierung der organischen Komponenten wird durch Osteoblasten sichergestellt. Sie befinden sich typischerweise an Knochenneubildungszonen und bilden das sogenannte Osteoid, eine Schicht noch nicht verkalkter Matrix. Außerdem bilden Osteoblasten eine Vielzahl von Zytokinen (u.a. IL-1/-6/-11, PDGF, TNF-α, TGF-β, IGF-I/II, CSF-1) welche die eigene Proliferation, Osteoidbildung und Aktivierung von Osteoklasten fördern. Die Mineralisation beginnt mit Unterstützung von Proteoglykanen und verschiedenen von Osteoblasten gebildeten Proteinen durch schrittweise Einlagerung von

anorganischen Substanzen in die organische Matrix. Durch die spezielle Anordnung von Hydroxyapatitkristallen und Kollagenfibrillen wird die typische Festigkeit von Knochengewebe erreicht. Aufgrund dieser Umbauprozesse werden Osteoblasten in die verkalkte Knochenmatrix eingemauert und somit weitestgehend inaktiviert [17].

2.2.2 Osteozyten

Bei Osteozyten handelt es sich um in die verkalkte Knochenmatrix eingekapselte Osteoblasten. Über Fortsätze in den Knochenkanälchen ist es den Osteozyten möglich untereinander zu kommunizieren. Zusammen mit Blutgefäßen wird so der Stoffaustausch von Metaboliten und Signalstoffen ermöglicht. Dadurch wird gewährleistet, dass das Knochengewebe auf mechanische Beanspruchung reagieren und die zelluläre Matrix aufrechterhalten kann [18].

2.2.3 Endostale Saumzellen

Endostale Saumzellen befinden sich an der inneren Schicht der Kortikalis, wo sie einen kontinuierlichen Zellverband bilden. Sie stehen mit Osteoklasten in Verbindung und sind wahrscheinlich an der Regulation der Knochenresorption beteiligt [17].

2.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, deren Vorläuferzellen die Monozyten sind, und gehören zum mononukleären Phagozytosesystem. Sie sind für die Demineralisierung und den Abbau der Knochenmatrix zuständig und besitzen eine Schlüsselfunktion für Umbauvorgänge sowie die Kalziumfreisetzung [17].

2.3 Wachstumsfaktoren

Es ist eine Vielzahl an Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren im Knochengewebe bekannt. Sie wirken regulatorisch bei der Osteo- und Chondrogenese, der Organogenese sowie bei der Knochenregeneration.

Wachstumsfaktoren des Knochens
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)
Transforming Growth Factors (TGF-α/-ß)
Insulin-Like Growth Factors (IGF-I/-II)
Acidic/Basic Fibroblast Growth Factor (a/bFGF)
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
Epidermic Growth Factor (EGF)
Cementum Derived Growth Factor (CGF)
Parathyroid Hormone Related Protein (PTHrP)
Osteogenic Growth Peptide (OGP)
Bone Morphogenetic Proteins (BMP)

Tab. 1: Wachstumsfaktoren des Knochen [19]

Lediglich BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9 besitzen nach aktuellem Wissensstand osteoinduktives Potential [20, 21].

2.4 Hüllstrukturen des Knochens

Die äußere Oberfläche des Knochens wird in großen Teilen von Periost bedeckt. Es besteht aus einer zellreichen inneren Schicht mit osteogenen und chondrogenen Vorläuferzellen (Stratum osteogenicum) und einer aus straffem, geflechtartigem kollagenem Bindegewebe bestehenden äußeren Schicht (Stratum fibrosum). Durch Bündel von Kollagenfibrillen (Sharpey-Faser) ist das Periost fest mit der Kortikalis verbunden. Die innere Hüllstruktur, das Endost, wird primär aus endostalen Saumzellen und extrazellulärer Matrix gebildet [17].

2.5 Feinbau des Knochens

In der Mikrostruktur wird Geflechtknochen von Lamellenknochen unterschieden. Geflechtknochen tritt beim Erwachsenen fast ausschließlich während der Frakturheilung oder anderer Reparaturprozesse auf und wird zumeist im Verlauf in Lamellenknochen umgewandelt. Typisch sind im Vergleich zum Lamellenknochen der geringe Mineralgehalt und eine eher zufällige Anordnung der Kollagenfibrillen. Eine Sonderform des Geflechtknochens ist der Bündelknochen, der zum Beispiel in der Wand von Zahnalveolen vorkommt und durch dicke nicht verflochtene Kollagenfaserbündel gekennzeichnet ist.

Das adulte Skelett wird hauptsächlich aus Lamellenknochen gebildet. Im Querschnitt kann man eine äußere kompakte Schicht (Substantia compacta) von Gebieten mit zahlreich untereinander verbundenen Höhlen (Substantia spongiosa) unterscheiden. Mikroskopisch weisen beide Organisationsformen die Struktur des Lamellenknochens auf, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Kollagenfasern und Matrix bilden zusammen 3-7 μm dicke Lamellen, die konzentrisch um einen zentralen Gefäßkanal (Havers-Kanal, Canalis centralis) angeordnet sind und in der Peripherie durch eine kollagenfreie 1-2 μm dicke Zementlinie begrenzt werden. Knochenlamellen und Havers-Kanal bilden zusammen das Osteon, die strukturelle Baueinheit des Lamellenknochens. Sie werden durch transversal verlaufende Volkmann-Kanäle, die ebenfalls Blutgefäße und Nerven enthalten, miteinander verbunden. Zwischen den Osteonen sind Aussparungen, in denen sich Osteozyten befinden, die durch kanälchenförmige Verbindungen miteinander verbunden sind.

In der Substantia compacta zeigen die Lamellen zusätzlich noch eine typische Organisation bestehend aus Osteon, inneren und äußeren Generallamellen sowie Schaltlamellen. Zur Markhöhle hin und direkt unter dem Periost befinden sich in ihrem Verlauf annähernd kreisförmige Generallamellen. Zwischen den inneren und äußeren Generallamellen finden sich zahlreiche Osteone und unregelmäßig geformte Stapel von Lamellen, den sogenannten Schaltlamellen. Die Substantia spongiosa besitzt weitgehend keine Osteone und wird aus Trabekellamellen gebildet. Sie sind dünn und werden aus halbmondförmigen Lamellenpaketen aufgebaut [17, 18].

2.6 Embryonale Entwicklung

Knochengewebe entsteht aus Mesenchymverdichtungen des Mesoderms ab der 6. Embryonalwoche. Prinzipiell können zwei Arten der Knochenentwicklung (Ossifikation) unterschieden werden: zum einen die direkte Mineralisierung der von den Osteoblasten sezernierten Knochenmatrix (desmale/membranäre oder direkte Ossifikation) und zum anderen der Umbau von Knorpelgewebe zu Knochengewebe (enchondrale oder indirekte Ossifikation). Bei beiden Vorgängen entsteht zunächst Geflechtknochen, welcher im Verlauf durch Lamellenknochen ersetzt wird [18].

2.6.1 Desmale/Membranäre (direkte) Ossifikation

Bei der desmalen Ossifikation wandeln sich zu Beginn osteogene Mesenchymzellen in syntheseaktive Osteoblasten um, welche das Osteoid bilden. Durch schrittweise Anlagerung von anorganischen Substanzen beginnt die Mineralisation des Knochengewebes, wodurch es zur Bildung von primärer Spongiosa aus Geflechtknochen kommt. Aus den Osteoblasten sind damit Osteozyten entstanden, die über ihre Fortsätze in den Knochenkanälchen weiterhin in Kontakt bleiben und so zusammen mit einsprossenden Blutgefäßen den Stoffaustausch des Knochens ermöglichen. Die Umwandlung zu Lamellenknochen entsteht zum einen durch Auflagerung von Knochenlamellen auf die primären Trabekel mit anschließendem Abbau der Trabekel durch Osteoklasten (sekundäre Spongiosa) und zum anderen durch Kompaktierung durch Bildung primärer Osteone um Blutgefäße in den Zwischenräumen der Spongiosa und an der periostalen Oberfläche des Knochens [17].

2.6.2 Chondrale (indirekte) Ossifikation

Die chondrale Ossifikation hat ihren Startpunkt bei schon zuvor gebildetem hyalinem Knorpel und verläuft in zwei Stufen. Bei diesem Modell hypertrophieren zunächst Chondrozyten, gehen anschließend zugrunde und werden durch Osteoklasten abgebaut oder verkalkt. So entstehen freie Räume, in die daraufhin Stammzellen mit Blutkapillaren

einsprossen können. Aus den mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich wiederum Osteoblasten, die Knorpelmatrix mit Knochenmatrix überziehen [18].

2.7 Knochendefektheilung

Zur Wiederherstellung von Stabilität und mechanischer Funktion können bei Frakturen oder Knochendefekten die primäre Frakturheilung durch Proliferation der Havers-Kanäle und die sekundäre Frakturheilung durch Kallusbildung voneinander unterschieden werden [22].

2.7.1 Primäre Frakturheilung

Voraussetzung für die primäre Frakturheilung ist entweder der direkte Kontakt der Frakturenden (Kontaktheilung; Frakturspalt < 0,01 mm) [23] oder ein Frakturspalt von unter 1 mm (Spaltheilung) [24]. Die exakte anatomische Reposition der Frakturenden und ein entsprechend axialer Druck, der lediglich physiologische Mikrobewegungen (zwischen 1000 und 10000 μstrain) im Bereich des Defektes zulässt, sind weitere Voraussetzungen für eine direkte Knochenheilung. Nekrotische Areale des Knochens werden durch Erosionstunnel abgebaut und durch neue Osteone ersetzt [17]. Durch Proliferation der Havers-Kanäle werden die Frakturenden quer zum Bruchspalt primär miteinander verbunden. Somit wird ermöglicht, dass Blutgefäße zusammen mit Osteoblasten in den Frakturspalt einwachsen können. Anschließend kommt es zu einem direkten Durchwachsen des Frakturspalts mit neuen Osteonen und zur Wiederherstellung von lamellären Knochen ohne die Ausbildung eines Kallus [22].

2.7.2 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre Frakturheilung läuft ab, wenn der Frakturspalt zu weit, nicht ausreichend stabil oder die lokale Blutversorgung nicht optimal ist. Sie ist gekennzeichnet durch Kallusbildung und verläuft typischerweise in mehreren Phasen [22, 25]:

Phasen der sekundären Frakturheilung		
Phase 1	1. Woche	Ausbildung eines Frakturhämatoms Aseptische Entzündungsreaktion mit Sekretion von TNF-α und Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-11 und IL-18) Rekrutierung inflammatorischer Zellen und Induktion der Angiogenese Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen Exprimierung von Bone Morphogenetic Protein (BMP)
Phase 2	2. Woche	Einwachsen von fibrinreichem Granulationsgewebe in das Blutkoagulum Ausbildung eines stabilisierenden bindegewebigen Kallus um den Defekt
Phase 3	3.-4. Woche	Beginn der desmalen und chondralen Ossifikation Neoangiogenese und Revaskularisation der Frakturenden Ersatz des weichen Kallus durch Geflechtknochen
Phase 4	Ab 4. Woche	Transformation des Geflechtknochens, entsprechend der funktionellen Beanspruchung, in Lamellenknochen

Tab. 2: Phasen der sekundären Frakturheilung

3 Knochenersatzmaterialien

3.1 Transplantationsterminologie

Transplantatart	Herkunft des Transplantates	Reaktion des Empfängers
Autogenes Transplantat	Spender und Empfänger sind identisch	Keine Abstoßungsreaktion
Isogenes Transplantat	Spender und Empfänger sind genetisch identisch	Keine bzw. schwache Abstoßungsreaktion
Allogenes Transplantat	Spender und Empfänger sind genetisch different, gehören aber derselben Spezies an	Zelluläre und humorale Abstoßungsreaktion
Xenogenes Transplantat	Spender und Empfänger sind genetisch different und gehören verschiedenen Spezies an	Humorale, selten zelluläre Abstoßungsreaktion
Alloplastisches Material	Ersatz körpereigenen Gewebes durch künstlich hergestellte Materialien	Keine Abstoßungsreaktion

Tab. 3: Transplantationsterminologie

3.2 Ideale Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien

Biokompatibilität: Die Biokompatibilität von KEM gewährleistet aufgrund fehlender antigener Eigenschaften, dass der Empfänger keine immunogene (abstoßende) Reaktion auf das Transplantat zeigt.

Osteokonduktion: Beschreibt die Fähigkeit von KEM, als künstliche Matrix und somit als Leitstruktur zur Gefäßeinsprossung zu fungieren.

Osteopromotion: KEM sollten eine stimulierende Wirkung auf osteogene Zellen besitzen, um so die Neubildung von Knochen zu fördern (osteopromotive Wirkung) oder sogar die Knochenneubildung dort zu ermöglichen, wo keine zu erwarten war.

Osteoinduktion: Der Einfluss von Knochenproteinen, wie zum Beispiel Bone Morphogenic Protein (BMP) auf mesenchymale Stammzellen wird als Osteoinduktion bezeichnet. Das Ziel ist hierbei die Differenzierung der pluripotenten Mesenchymzellen zu knorpel- bzw. knochenbildenden Zellen.

Porosität: Weiterhin spielt die Porosität der verwendeten KEM aufgrund der für die Aufbau- und Resorptionsvorgänge notwendigen Vaskularisation eine wichtige Rolle. Ein Porendurchmesser von über 100 μm gewährleistet eine ausreichende Vaskularisation, jedoch muss beachtet werden, dass bei steigender Porosität die mechanische Stabilität des Transplantates nachlässt.

Belastungsstabilität: KEM sollten eine mechanische Stabilität und Festigkeit haben, die eine schnellstmögliche Belastung ermöglichen.

Resorbierbarkeit*:* Die Resorption des Substitutes muss in derselben Geschwindigkeit ablaufen wie die Ausbildung von körpereigenem Knochen, da es sonst zur Ausbildung biomechanisch minderwertiger Strukturen kommt.

Sterilität: KEM müssen ohne den Verlust ihrer positiven Eigenschaften sterilisiert werden können.

Freie Verfügbarkeit

Kostengünstig Herstellung

[26-30]

3.3 Transplantatlager

Nach Lexer [31] werden drei Arten des Transplantatlagers unterschieden:

- ersatzstarkes Transplantatlager
    - gut durchblutet
    - knöchernes Lager
- ersatzschwaches Transplantatlager
    - schlecht durchbluteter Knochen
    - gesunde Muskulatur
- ersatzunfähiges Transplantatlager
    - Narbengewebe und/oder Infektion am Implantationsort

Das Gewebe des ersatzstarken Transplantatlagers zeichnet sich durch gute Vaskularisation und Vitalität aus, während das Gewebe im ersatzunfähigen Lager weitgehend avital, schlecht vaskularisiert und zugleich meist mechanisch instabil ist. Schweiberer et al. [32-34] untersuchten in diversen Studien die Bedeutung des Lagertyps in Bezug auf das Einwachsverhalten von Knochentransplantaten. Folgende Faktoren wurden als essenziell beschrieben:

- mechanische Ruhe des Transplantatlagers
- Vaskularisationsfähigkeit des Transplantatlagers und des Transplantates
- direkter Kontakt des Transplantates mit dem Transplantatlager

Urist et al. [35] bestimmten zusätzlich noch die folgenden Faktoren als maßgebend für den Erfolg einer Knochentransplantation:

- Ort des Transplantatlager
- Vitalität des Knochentransplantates
- Defektvolumen
- Konzentration an osteoinduktiven Faktoren
- Metabolischer Aktivitätsindex der betroffenen Spezies

3.4 Knochenersatzmaterialien

3.4.1 Autologe (autogene) Knochentransplantate

Die Verwendung von autologen Knochentransplantaten ist nach wie vor der Goldstandard zur Augmentation von Kieferknochendefekten [36]. Hierbei wird körpereigenes Gewebe des gleichen Individuums von einer Körperregion auf eine andere übertragen. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden besteht darin, dass das osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Potential weitgehend erhalten bleibt, da neben Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen und mesenchymalen Stammzellen insbesondere Differenzierungsproteine (z.B. BMP) und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF-β, IGF oder PDGF) bereitgestellt werden. Als Spenderorte stehen intraoral Symphysenregion, Kieferwinkel, Unterkieferrand, Retromolarregion, Tuberbereich, umliegender Alveolarkamm im OP-Bereich, Gaumen, zahnlose Kieferabschnitte, Exostosen und die Kinnregion zur Verfügung. Extraoral können Transplantate aus Beckenkamm, Schädelkalotte, Rippe, Tibia und Fibula gewonnen werden. Je nach benötigter physikalischer Stabilität, Form und Größe des Defektes können reine Spongiosatransplantate, kortikospongiöse Blocktransplantate oder Spongiosa- und Kortikalismischtransplantate verwendet werden [37].

Vorteile	Nachteile
Keine immunologische Abwehrreaktion	Begrenzte Verfügbarkeit und hohe Resorptionsneigung
Transplantation vitaler Zellen: osteoinduktiv und osteogenetisch	Begrenzte Lagerfähigkeit
Leitschienenfunktion: osteokonduktiv	Hohe Kosten
Biokompatibel: atoxisch, nicht antigen, nicht mutagen, akanzerogen	Weitere operative Maßnahmen notwendig, Komplikationen am zweiten Operationssitus: z.B. Infektionen, Hämatome, Nervenläsionen
Bekannte biologische und biomechanische Eigenschaften	Verlängerte Operationsdauer

Tab. 4: Vor- und Nachteile autologer Knochentransplantate [19, 38-40]

3.4.2 Allogene Knochentransplantate

Bei der allogenen Knochentransplantation wird Knochen von einem genetisch differenten Spender derselben Spezies auf einen Empfänger übertragen [41]. Gerade wenn die Verfügbarkeit von autogenem Ersatz zu gering bzw. der aufzubauende Defekt zu groß ist, hat sich die Transplantation von allogenem Material als gute Alternative hervorgetan.
Die Hauptprobleme dieser Methode sind die Gefahr der Transplantatabstoßung aufgrund der antigenen Eigenschaften des Transplantates und die Übertragung von viralen und bakteriellen Infektionskrankheiten [42-45].
Die Reduktion der Antigenität und Infektiösität wird durch Lypholisierung (=Gefriertrocknung, bei -70 °C), Deproteinisierung und Kryokonservierung erreicht, jedoch kann ein Restrisiko einer immunologischen Reaktion bzw. Infektion nicht sicher ausgeschlossen werden [46] [47].
Über sogenannte Knochenbanken kommen zwei Arten von allogenen Knochentransplantaten zur klinischen Verwendung:

- FDBA: Freeze-Dried Bone Allograft
- DFDBA: Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft

FDBA enthält noch aktive Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, während durch die zusätzliche Demineralisierung bei DFDBA ein Funktionsverlust dieser auftritt [47-49]. Die osteoregenerativen Eigenschaften beruhen daher vor allem auf der Bereitstellung poröser Leitstrukturen (Osteokonduktion), wodurch es zu einem schleichenden Abbau und Ersatz kommt. Osteoinduktives Potential ist zwar vorhanden, jedoch ohne klinische Relevanz [50].

Vorteile	Nachteile
Lagerung in Knochenbanken	Möglichkeit der Antigenität
Nahezu unbegrenzt verfügbar	Infektionsübertragung möglich
Leitschienenfunktion (Osteokonduktion)	Implantation devitaler Zellen
Keine Risiken durch zusätzliche operative Maßnahmen	Verringerte biologische und biochemische Eigenschaften (aufgrund der physikalischen und chemischen Aufbereitung)
	Aufklärungs- und Haftungsproblematik
	Hohe Kosten (z.B. Lagerhaltung)

Tab. 5: Vor- und Nachteile allogener Knochentransplantate [19, 38]

3.4.3 Xenogene Knochentransplantationen

Unter xenogenen Knochentransplantaten versteht man Knochengewebe, welches von einer genotypisch unterschiedlichen Spezies auf eine andere übertragen wird [51]. Verwendet werden sowohl tierische (z.B. Rind) als auch pflanzliche Materialien (z.B. Koralle). Diese bestehen vorwiegend aus Hydroxylapatit, dem Hauptbestandteil der anorganischen Komponente des Knochens. Wie allogene Transplantate besitzen xenogene Transplantate hauptsächlich osteokonduktive Eigenschaften, da sämtliche zellulären Bestandteile durch Deproteinisierung und Sterilisation aufgrund der Gefahr der Erregerübertragung und immunogener Abstoßungsreaktionen entfernt wurden [51, 52].

Vorteile	Nachteile
Keine Risiken durch zusätzliche operative Maßnahmen	Möglichkeit der Antigenität
Nahezu unbegrenzt verfügbar	Infektionsübertragung möglich
Leitschienenfunktion (Osteokonduktion)	Implantation devitaler Zellen
	Verringerte biologische und biochemische Eigenschaften (aufgrund der physikalischen und chemischen Aufbereitung)
	Aufklärungs- und Haftungsproblematik

Tab. 6: Vor- und Nachteile xenogener Knochentransplantate [19, 38]

3.4.4 Alloplastische Knochenersatzmaterialien

Alloplastische Knochenersatzmaterialien werden entweder vollsynthetisch oder durch Aufbereitung tierischer bzw. pflanzlicher Gewebearten hergestellt (halbsynthetisch). Die osteoregenerativen Eigenschaften beruhen hier ausschließlich auf Osteokonduktion, jedoch kann durch Kombination mit beispielweise Bone Morphogenetic Protein (BMP) eine zusätzliche osteoinduktive Wirkung erreicht werden [53, 54]. Der osteokonduktive Effekt alloplastischer Materialien hängt von Partikelgröße, Porosität sowie der chemischen Struktur und Zusammensetzung ab [55]. Beispielsweise ist eine Porengröße von über 300 μm vorteilhaft für Neoangiogenese und Knochenneubildung, jedoch wirkt sich eine hohe Porengröße auch negativ auf ihre mechanische Stabilität aus [56].
Osborn et al. haben entsprechend der Biokompatibilität bzw. Bioaktivität eine Unterteilung dieser Materialien formuliert. Je nach Reaktion des Knochens werden biotolerante, bionierte und bioaktive Materialien unterschieden [57, 58]:

- **Biotolerante Materialien** (z.B. Knochenzement): bindegewebige Einscheidung **(Distanzosteogenese)**
- **Bionierte Materialien** (z.B. Kunststoff- oder Titanimplantate): Es kommt zu einem direkten Kontakt zwischen Implantat und Knochen **(Kontaktosteogenese)**

- **Bioaktive Materialien** (z.B. HA, TCP, Glaskeramiken): chemische Verbindung zwischen Implantat und Knochen, Interaktion mit lebendem Gewebe, Differenzierung von Vorläuferzellen **(Verbundosteogenese)**

Häufige verwendete alloplastische Knochenersatzmaterialien in der Implantologie sind Hydroxylapatit, Tricalciumphosphat und bioaktive Gläser.

Hydroxylapatite (HA; z.B. Ostim©) gehören zu den nicht degradierbaren Biokeramiken auf Calciumphosphatbasis und können entweder synthetisch hergestellt oder durch Sinterung von xenogenem Material (z.B. Bovin oder Alge) gewonnen werden. Es ist mechanisch stabil und wird kaum vom Organismus resorbiert [59].

Tricalciumphosphate (TCP) liegen in zwei Modifikationen vor:

- α-TCP: entsteht bei einer Sinterungstemperatur zwischen 1125 und 1430 °C
- β-TCP: entsteht bei einer Sinterungstemperatur um 1200 °C

α-TCP (z.B. Biobase©) hat den Nachteil, dass es in flüssigem Milieu zu HA hydrolisiert und somit kaum resorbiert werden kann. β-TCP (z.B. Cerasorb©) ist in der Implantologie das am häufigsten verwendete alloplastische Knochenersatzmaterial. Es besitzt gute Resorptionseigenschaften und zeigt eine hohe Biokompatibilität, hat jedoch im Vergleich zu HA eine geringere mechanische Stabilität [59, 60].

Bioaktive Gläser (z.B. Biogran©, Perioglas©) sind eine Gruppe resorbierbarer, amorpher, oberflächenreaktiver Keramiken, welche aus einer Glasphase aus Siliziumdioxid und Natrium-, Kalzium- und Phosphatoxiden bestehen. Treten diese in Kontakt mit Körperflüssigkeiten, kommt es zur Korrosion der Oberflächenstruktur mit Auflagerung einer siliziumreichen Gelschicht und Calciumphosphat. Diese hat durch Absorption von Proteinen und extrazellulärer Knochenmatrix einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung [59].

Vorteile	Nachteile
Gute Lagerfähigkeit	Bindegewebige Einscheidung nicht resorbierbarer Ersatzmaterialien
Nahezu unbegrenzt verfügbar	Entzündliche Gewebereaktion
Meist resorbierbare Stoffe	Gemisch von unterschiedlichen chemischen Phasen
Keine weiteren operativen Eingriffe	Nicht alle Ersatzstoffe sind sterilisierbar
Keine Gefahr der Krankheitsübertragung	Persistenz durch mangelnden oder fehlenden Aufbau

Tab. 7: Vor- und Nachteile alloplastischer Knochenersatzmaterialien [19, 38, 61, 62]

4 Knochenaufbaumethoden

4.1 Geführte Knochenregeneration

Das Prinzip der geführten Knochenregeneration (Guided Bone Regeneration, GBR) besteht darin, dass eine Barriere zwischen dem knöchernen Defekt und dem umliegenden Weichgewebe geschaffen wird. Besteht bei einem Knochendefekt Kontakt zu Weichgewebe, kommt es zu einem Konkurrieren der Wundheilung dieser beiden Gewebearten. Durch die schnellere Regenerationseigenschaften des Weichgewebes mit nachfolgender Ausbildung von Narbengewebe im Bereich des Knochendefektes ist die vollständige Regeneration des Knochens gestört. Durch die Abdeckung des Defektes mit einer Membran wird das Einwandern von bindegewebigen Zellen verhindert, so dass in dem so entstandenen Raum die Knochenneubildung ungestört ablaufen kann. Als Unterstützung der Knochenregeneration mit GBR-Techniken werden in die Defekte Knochenersatzmaterialien autogener, allogener oder xenogener Herkunft, teilweise kombiniert mit Wachstumsfaktoren oder osteoinduktiven Proteinen, verwendet.

Als Membrantypen stehen synthetisch resorbierbare und nicht-resorbierbare Materialien sowie bionativ abbaubare Materialien zur Verfügung:

Synthetisch nicht-resorbierbar	ePTFE (expandiertes Polytetrafluorethylen)	z.B. GoreTex®
	ePTFE titanverstärkt	z.B. Gore Tex Ti®
Synthetisch resorbierbar	Polyglactin 910	z.B. Vicryl®
	Poly-DL-lactid/Co-glycolid	z.B. Resolut®
	Poly-DL-lactid mit N-methyl-2-pyrrolidon	z.B. Atisorb®
	Polylactid/Polyglycolid Trimethylencarbonat	z.B. Oseoquest®
Nativ, bioabbaubar	Porkines Kollagen	z.B. Bio-Gide®
	Bovines Kollagen	z.B. Biomend®
	Humanes Kollagen	z.B. Alloderm®

Tab. 8: GBR-Membrantypen [63]

4.2 Distraktionsosteogenese

Das Prinzip der Distraktionsosteogenese macht sich die Regenerationsfähigkeit des Knochens zunutze und ist ein Beispiel für die Steuerbarkeit der Wundheilung mit mechanischen Mitteln. In den 1950er Jahren setzten Ilizarow et al. die Distraktionsosteogenese systematisch zur Extremitätenverlängerung ein. Der Knochen wird an einer bestimmten Stelle osteotomiert (durchtrennt) und durch einen sogenannten Distraktor mit Schrauben und Pins wieder fixiert. In dem entstandenen Osteotomiespalt bildet sich nun ein Kallus und die Phasen der sekundären Frakturheilung beginnen [64-66]. Je nach gewünschter Verlängerung bzw. Vergrößerung des Knochens kann der Distraktor nach einer Ruhephase von 5 bis 7 Tagen pro Tag ca. 0,8 bis 1 mm auseinandergezogen (distrahiert) werden. Der Knochen ist nun gezwungen über seine Reparaturmechanismen dem zunehmenden Defekt zu folgen. Ist die geforderte Distraktion erreicht, schließt sich eine ca. zwölfwöchige Retentionsphase an, in der sich neuer Knochen bilden kann [37].

Im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie wurde die Distraktionsosteogenese erstmalig in den frühen 1990er Jahren von McCarthy et al. zur Verlängerung einer Hypoplasie eines Unterkieferastes beschrieben [67]. In den folgenden Jahren wurden miniaturisierte intraorale Distraktoren entwickelt, wodurch äußerlich sichtbare Narben durch perkutane Apparaturen vermieden werden können. Die Distraktion kann im Bereich der Kiefer in vertikaler und horizontaler Richtung vorgenommen werden [68, 69].

4.3 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist definiert als ein interdisziplinäres Gebiet, in dem die Prinzipien der Ingenieurs- und Biowissenschaften gemeinsam Anwendung finden mit dem Ziel der Entwicklung von Biomaterialien zur Wiederherstellung, Aufrechterhaltung und Verbesserung der Gewebefunktion [70]. Das Ziel des Tissue Engineerings ist nicht der einfache Ersatz von Knochen durch Knochenersatzmaterialien, sondern beinhaltet vielmehr die Induktion der Bildung von körpereigenem Knochengewebe. Als die drei essentiellen Elemente des Tissue Engineerings zur Knochenregeneration wurden die Anwesenheit von einer Matrix, Zellen sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren postuliert [71].

Als eine Matrix wird ein dreidimensionales Gerüst bezeichnet, welches als Trägermaterial und Leitstruktur für die Knochenregeneration dient. Als Zellen können reife bereits differenzierte Osteoblasten verwendet werden. Diese können beispielsweise durch Biopsie vom Patienten entnommen, ex vivo vermehrt und anschließend zusammen mit einem Trägermaterial (Matrix) in den Knochendefekt eingebracht werden. Jedoch ist die Verwendung von autologen Osteoblasten aufgrund einer Limitierung der Vermehrbarkeit eingeschränkt. Eine Alternative dazu ist der Einsatz von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen. Durch die Zugabe von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie zum Beispiel Platelet Derived Growth Factors (PDGFs), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Insulin-Like Growth Factors (IGFs), Fibroblast Growth Factors (FGFs) und Transforming Growth Factor-β (TGF-β) kann die Differenzierung in Richtung knochenspezifischer Zellen gelenkt und so die Bildung von extrazellulärer Knochenmatrix induziert werden [72].

5 Ölige Calciumhydroxid-Suspension

Calciumhydroxid (CH) ist ein geruchloses, weißes Puder mit stark alkalischen Eigenschaften (pH 12,5-12,8). Die Löslichkeit in Wasser ist sehr niedrig und sinkt mit steigender Temperatur. In Alkohol ist es unlöslich [73]. Die Wirkung beruht auf der Dissoziation in Calcium- und Hydroxylionen, wenn CH in Kontakt mit Wasser kommt.

Durch die Freisetzung von Hydroxylionen kommt es zu einer Zerstörung der bakteriellen cytoplasmatischen Membran, Proteindenaturation und Schädigung der bakteriellen DNA und somit zu einer antibakteriellen Wirkung [73]. Weiterhin besitzt CH einen fördernden Effekt auf die Mineralisation von Hartgewebe. Durch den hohen pH-Wert wirkt es neutralisierend auf Laktat von Osteoklasten und aktivierend auf die alkalische Phosphatase, welche eine wichtige Funktion in der Formation von Hartgewebe darstellt.

Je nachdem, mit welchen Trägersubstanzen CH kombiniert wird, unterscheidet sich die Geschwindigkeit der Dissoziation in Calcium- und Hydroxylionen. Je höher die Viskosität ist, desto langsamer läuft die Dissoziation und umso länger verbleibt das Material im Applikationsgebiet. Man unterscheidet prinzipiell drei Arten von Trägersubstanzen [74]:

Wässrige Substanzen	Wasser, Kochsalzlösung, Anästhetika, Carboxymethycellulose, Ringer-Lösung
Visköse Substanzen	Glycerin, Polyethylenglycol, Propylenglycol
Ölige Substanzen	Olivenöl, Silikonöl, Campher, Metacresylacetat [75]

Tab. 9: Arten von Trägersubstanzen

In dieser Studie wurde die Wirkung öliger Calciumhydroxid-Suspension (Osteora®) auf Knochengewebe untersucht. Es handelt sich dabei um ein Material mit weißem, cremigem Aussehen und es besitzt laut Herstellerangaben auf exponierten Knochenoberflächen eine sofortige und langanhaltende osteoformative, bakteriostatische, antiinflammatorische und analgetische Wirkung.

Parameter	Osteoinductal	Kontrolle
Bakterien	Starke Reduktion	Kein Einfluss
Osteoblastendifferenzierung	Starke Zunahme	Reduktion
Osteoblastenwachstum	Starke Zunahme	Kein Einfluss
Osteoblasten-DNA-Synthese	Reduktion	Kein Einfluss
Osteoblasten-Kollagen-Synthese	Sehr starke Zunahme	Kein Einfluss
Gewebekollagen-Synthese	Sehr starke Zunahme	Kein Einfluss
Osteoblasten-LDH-Aktivität	Starke Zunahme	Kein Einfluss
Gewebe-LDH-Aktivität	Sehr starke Zunahme	Kein Einfluss
Osteoblasten-PGE2-Aktivität	Zunahme	Zunahme
Gewebe-PGE2-Aktivität	Zunahme	Kein Einfluss
Gewebe-ALP-Aktivität	Starke Zunahme	Kein Einfluss
Gewebe-AP-Aktivität	Kein Einfluss	Kein Einfluss
Gewebe-Osteocalcin-Synthese	Starke Zunahme	Kein Einfluss
Gewebe-Kollagenasen-Aktivität	Reduktion	Starke Zunahme

Tab. 10: Wirkung von OCHS auf die wichtigsten Parameter des Knochenstoffwechsels [76]

In Kulturen mit humanen Knochenzellen konnte ein stimulierender Effekt auf Differenzierung, Metabolismus und Wachstum von Osteoblasten nachgewiesen werden. Dietz et al. untersuchten dabei den Einfluss von CH auf vitales humanes Knochengewebe mit dem Ergebnis einer Stimulation der metabolischen Marker der Knochenregeneration und einer Hemmung der Knochenresorption durch Inhibition proteolytischer Enzyme (z.B. Kollagenasen) [77]. Kohal et al. führten die Reduktion der Knochenresorption auf die Neutralisation der sauren Metaboliten von Makrophagen und Bakterien, die Aktivierung der alkalischen Phosphatase von Osteoblasten und die Verstärkung der metabolischen Aktivität von osteoformativen Zellen zurück [16].

OCHS wird als Depot in den Defekt appliziert. Die langsame Resorption der öligen Komponente durch Makrophagen bewirkt die Freisetzung von CH in den Zwischenraum von OCHS und Knochenoberfläche. Im Vergleich mit wässrigen CH-Suspensionen, die einen pH-Wert-Anstieg auf 12 bis 13 bewirken, kommt es bei OCHS zu einem milderen Anstieg des pH-Wertes auf nur 8 bis 10,5. Dies gewährleistet einen stimulierenden Effekt auf Osteoblasten

und Fibroblasten, während die Aktivität von Bakterien und Osteoklasten weiterhin inhibiert wird [78].

Der Hersteller gibt für Osteora folgende Indikationen für das Präparat an:

- **Hauptindikationen**
    - Behandlung periodontaler Defekte (offene und geschlossene Kürettage)
    - Versorgung von Alveolen nach Extraktionen (Socket Grafting)
    - Behandlung der Alveolitis sicca
    - Große apikale Knochendefekte nach chirurgischer Entfernung retinierter Zähne
- **Weitere Indikationen**
    - Hervorragende Wundheilungseigenschaften bei Auffüllungen von Zysten, Resektionsdefekten, Alveolen
    - Periodontale intraossäre Defekt-Wundabdeckung in der Implantologie
    - Prophylaxe und Therapie der trockenen Alveole und Knochenherden

6 Material und Methoden

6.1 Allgemeines

Die vorliegende Studie entstand in Zusammenarbeit der Victor Babeș Universität für Medizin und Pharmazie Timişoara (Rumänien) und der Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
Das Studienprotokoll wurde durch das Committee on Animal Ethics der Victor Babeș Universität für Medizin und Pharmazie Timişoara genehmigt (Approval of the research project No. 12703 from 27.03.2007)
Das chirurgische Procedere, die Tötung der Tiere sowie die Probengewinnung wurde durch die Kollegen der Victor Babeș Universität für Medizin und Pharmazie Timişoara durchgeführt. Die immunhistologische Probenaufbereitung und die histomorphometrische

Analyse erfolgte durch den Doktoranden im Labor der Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

6.2 Das Göttinger Minischwein als Versuchsschwein

In der vorliegenden Studie wurden vier Göttinger Minischweine mit einem Gewicht zwischen 15,5 kg und 19,5 kg verwendet. Das Studienprotokoll wurde durch das Committee on Animal Ethics der Victor Babeș Universität für Medizin und Pharmazie Timişoara genehmigt (Approval of the research project No. 12703 from 27.03.2007)

Das Schwein als Versuchstier zeigt große Ähnlichkeiten zum Menschen in Bezug auf physiologische und anatomische Gegebenheiten. Es hat hinsichtlich der Thrombozytenzahlen, Blutgerinnungsparameter und Struktur von langen Röhrenknochen eine große Nähe zum Menschen [79].

Neben der Vergleichbarkeit in Bezug auf die anatomischen, physiologischen und metabolischen Gegebenheiten [80-83] ist das Schwein auch immer beliebter zur Untersuchung von Mechanismen der Knochenregeneration geworden [81, 84]. Beispielsweise ist die Rate der Knochenregeneration (1,2 bis 1,5 mm pro Tag) Vergleichbar mit dem Menschen (1,0 bis 1,5 mm pro Tag). Diese sind somit deutlich näher an den Werten des Hundes oder des Schafes [81, 85].

Ebenso sind Knochenregenerationsprozesse einschließlich der trabekulären und intrakortikalen Regeneration mit dem Menschen vergleichbar [81, 86, 87]. Schlegel et al [88] demonstrierte 2009 in einer Studie am Minischwein zur de novo Knochenformation, dass die morphologischen und anatomischen Knochencharakateristika auf den Menschen übertragbar sind. Mikroradiographisch konnte dort kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Mineralisationsrate gefunden werden.

Somit stellt das Göttinger Minischwein mit seinen morphologischen, physiologischen und anatomischen Gegebenheiten ein verlässliches Modell zur Aussagekraft, Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit von knochenregenerativen Eigenschaften auf den Menschen dar.

6.2 Chirurgisches Procedere

Alle Tiere erhielten als Prämedikation eine intramuskuläre Injektion von 1%igem Atropin (0,04 mg/kg). Nach Durchführung der intramuskulären Sedation mit 2%igem Azepromazin (1,1 mg/kg) und 10%igem Ketamin (20 mg/kg) wurde mit Thiopental-Sodium (4 mg/kg) die intravenöse Narkose eingeleitet. Während des Eingriffs wurde die Narkose inhalativ mit einem Gemisch von Sauerstoff und Halothan (1-1,5%) aufrechterhalten.

Um eine ausreichende Hydration der Tiere zu gewährleisten, erhielten alle Tiere perioperativ 300-500 ml physiologische Kochsalzlösung. Postoperativ wurde die Analgesie durch intramuskuläre Injektion von Ketonal (0,05 mg/kg) sichergestellt.

Sofort nach Operation wurden Röntgenaufnahmen der experimentellen Seite angefertigt. Keines der Tiere zeigte postoperative Funktionseinschränkungen der Bewegung. Bis zur Nahtentfernung nach 7 Tagen wurden alle Tiere separat in eigenen Boxen überwacht, bevor sie zusammen in einer Gruppe gehalten wurden. Um die Temperatur der operierten Tiere auf einem möglichst optimalen Wert zu halten, betrug die Raumtemperatur 22 °C.

Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Betadine erfolgte die operative Freilegung der medialen Seite der Tibia. Danach wurde eine Osteosyntheseplatte mit drei Schraubenlöchern platziert, um die Öffnung der zentralen Titanschraube an der medialen Seite der Tibia zu positionieren. Unter kontinuierlicher Spülung mit steriler 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung wurde ein Loch gebohrt und eine zentrale Titanschraube im Zentrum des zukünftigen Defekts eingebracht. Mittels eines Diamantfräsers wurde ein rechteckiger kortikaler Knochendeckel (2 cm Länge / 1,5 cm Breite) auf der medialen Seite der Diaphyse geschaffen und vorsichtig durch einen Knochenmeißel entfernt. Durch diesen Zugang wurde daraufhin das Knochenmark samt der nutritiven Arterie entnommen, um so einen circa 2 cm x 2 cm großen Defekt zu schaffen. Um zu gewährleisten, dass das Volumen des Defektes dem geplanten Volumen entsprach, wurde so viel Knochenmark entfernt, bis der Defekt exakt 2 ml Kochsalzlösung aufnehmen konnte. Die Defekte der Kontrollgruppe wurden vollständig mit Osteora aufgefüllt. Die Defekte der Kontrollgruppe wurden mit Blut, gewonnen aus der Arteria retroauricularis, aufgefüllt.

Infolgedessen wurden die Knochendeckel repositioniert und durch eine Osteosyntheseplatte mit zentraler Titanschraube sowie zwei zusätzliche Schrauben kranial und kaudal des Defektes fixiert. Der Wundverschluss erfolgte schichtweise mit resorbierbaren Nähten (D-

Tek 3.0). Die Hautnaht erfolgte durch Einzelknopfnähte mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (D-Tel 3.0). Abschließend wurden die Wunden mit flüssigem Desinfektionsmittel desinfiziert.

6.3 Abbildungen

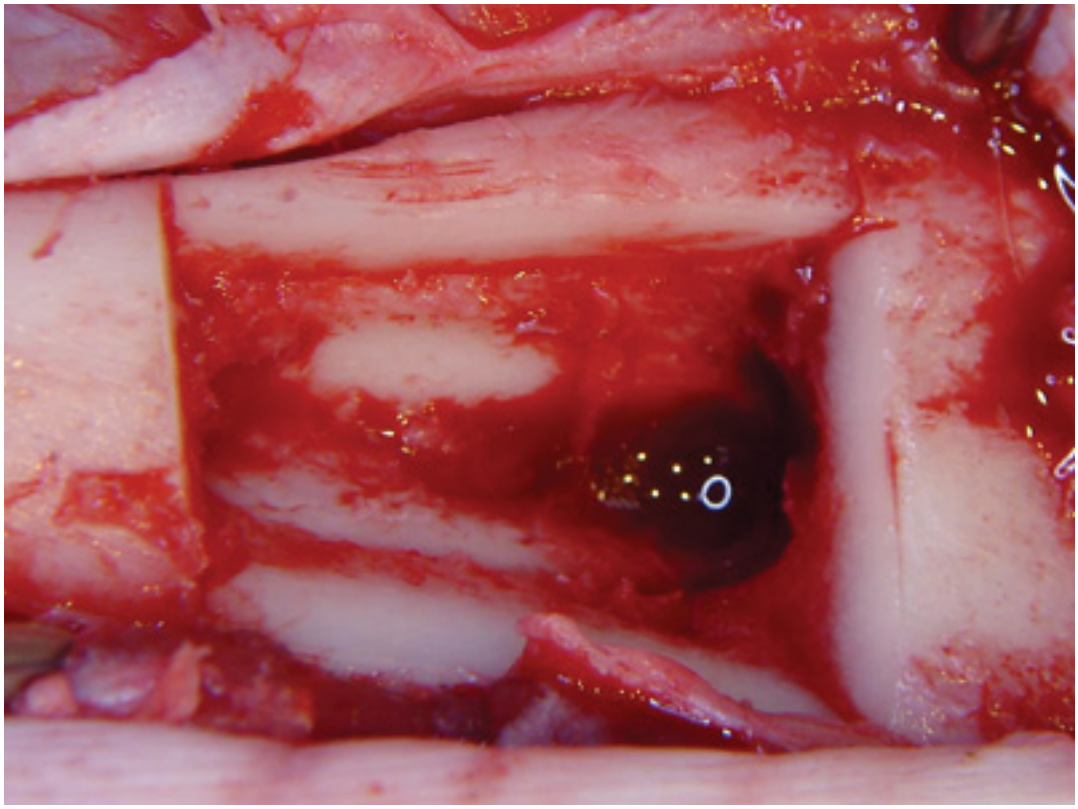


Abb. 1 a: Konfiguration des Defektes in der Schweinetibia

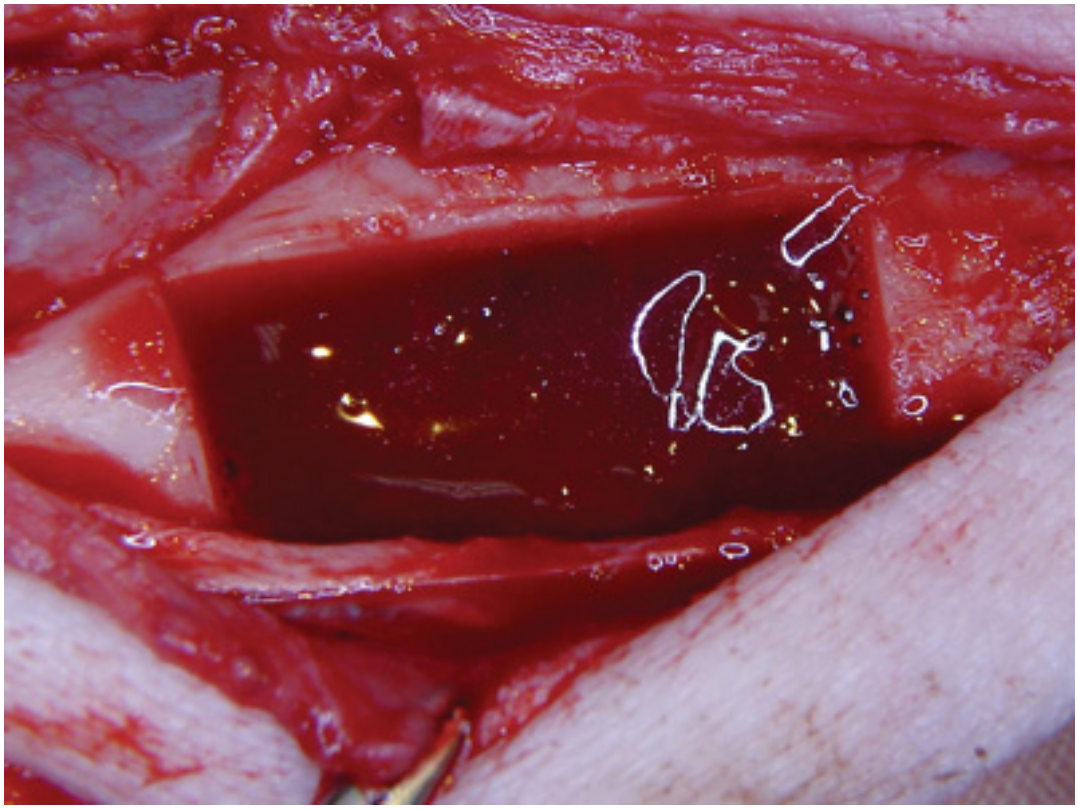


Abb. 1 b: Kontrollgruppe gefüllt mit Blut

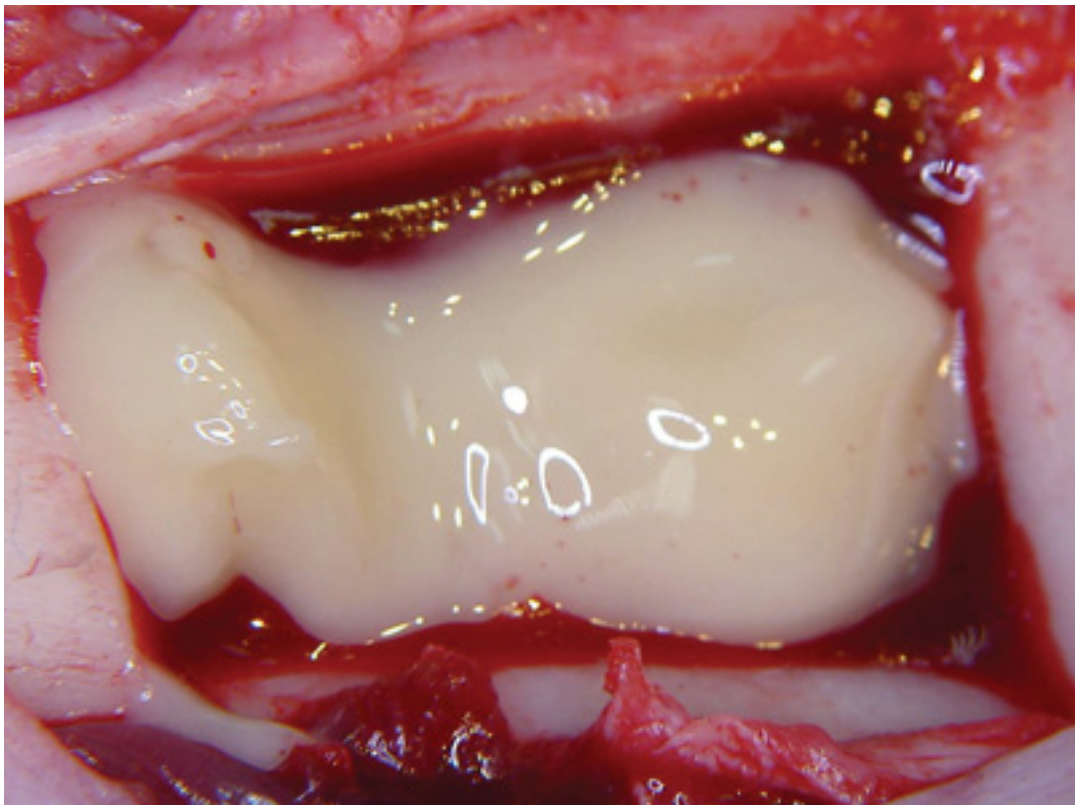


Abb. 1 c: Versuchsgruppe gefüllt mit Osteora

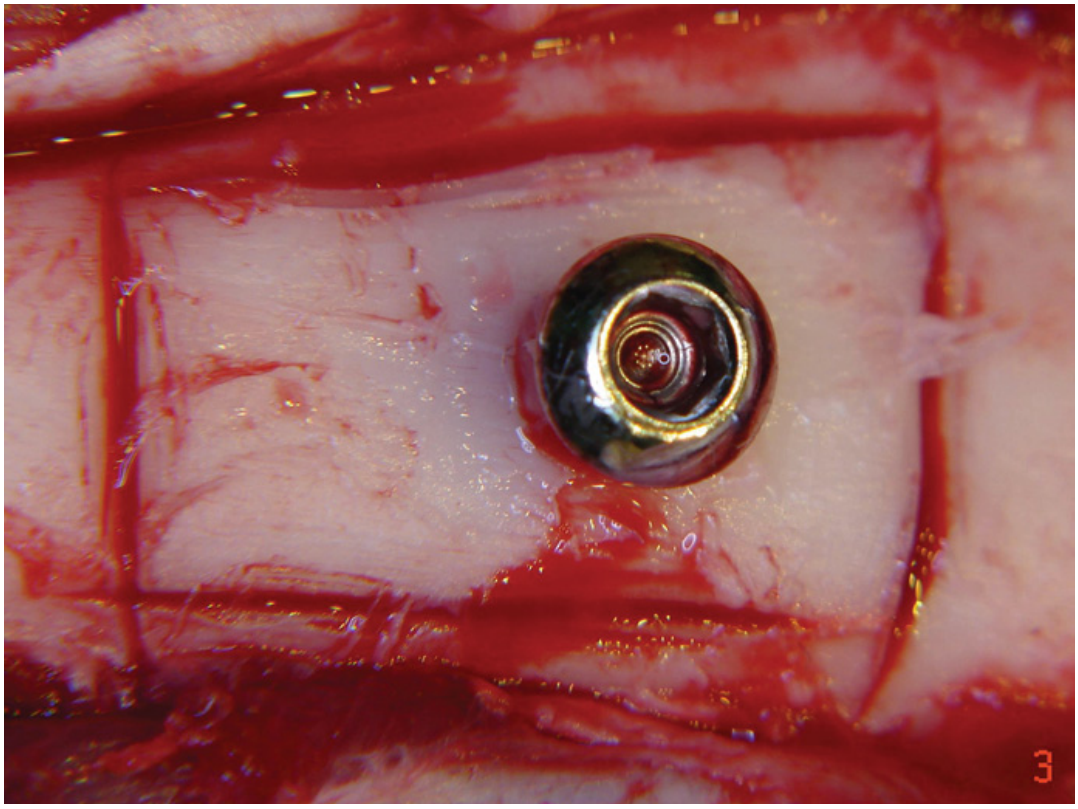


Abb. 1 d: Repositionierter Knochendeckel

6.4 Tötung der Tiere und Probengewinnung

Nach einer Einheilzeit von 4 und 8 Wochen wurden je zwei Tiere, eines aus der Versuchsgruppe und eines aus der Kontrollgruppe, nach dem Zufallsprinzip getötet. Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch intrakardiale Injektion von 20-40 ml einer 20%igen Kaliumchloridlösung. Die behandelten Schienbeine wurden aus den Extremitäten präpariert, das Weichgewebe entfernt und die Knochenblöcke mit den enthaltenen Proben gewonnen. Nach Entfernung der Osteosyntheseplatten wurden alle Proben in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung über 4 Wochen fixiert.

6.5 Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung erfolgte durch den Doktoranden im Labor der Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Alle Proben wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Alkohol entwässert und in Xylol eingelegt. Anschließend wurden die Proben mit Methyl-Methacrylat Monomer (MMA; Technovit 9100 Neu, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) infiltriert und zur Herstellung von nicht entkalkten Hartgewebsschnitten in Methyl-Methacrylat Monomer eingebettet. Um jeglichen negativen Einfluss der Polymerisationswärme während dieses Prozesses zu vermeiden, lief die Polymerisation unter kalter Atmosphäre bei -4 °C ab. Nach 20 Stunden waren alle Proben vollständig polymerisiert. Die Diaphysen der Schienbeine wurden mittels einer diamantierten Bandsäge (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Germany) transversal geschnitten. Die Schnitte erfolgten senkrecht zur Längsachse des Knochens direkt unterhalb der Epiphyse absteigend bis zur Mitte der Diaphyse unterhalb des mit dem kortikalen Knochendeckel verschlossenen Defektes mit dem Ergebnis von annähernd 500 Mikrometer dicken Schnitten. Anschließend wurden alle Proben mittels Acrylzement (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) auf silanisierte Objektträger (Super Frost, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) aus Glas geklebt und bis auf eine endgültige Dicke von 20 Mikrometer reduziert. Die Proben wurden mit Toluidinblau angefärbt.

6.5.1 Schritt 1 - Technovit 9100 Einbettung

1. Fixation: Die Fixierung des Präparates erfolgt in Formalin. Hierdurch werden komplexe intra- und supravitale Stoffwechselprozesse und postmortale Zerfallserscheinungen gestoppt.

2. Dehydratation: Die Entwässerung erfolgt bei Raumtemperatur durch eine Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 99%), wodurch ein Schrumpfen oder Zerreißen der Probe verhindert wird. Hierdurch kommt es zur Verdichtung und Härtung des Gewebes.

3. Entfettung der Probe: Das Intermedium Xylol verdrängt den Alkohol und mischt sich mit dem späterem Einbettmedium Technovit 9100 Basislösung (Methylmethacrylat). Das Einbettmedium verdrängt wiederum vollständig das Xylol.

4. Präinfiltration:

I. Gemisch aus Technovit 9100 Basisflüssigkeit und Xylol Im Verhältnis 1:1

II. Gemisch aus 200ml Technovit 9100 Basisflüssigkeit und einem Katalysatorsystem aus Peroxid und Amin (1g Technovit 9100 Härter 1)

III. Gemisch aus 200ml entstabilisiertem Technovit 9100 (Al_2O_3) und 1g Technovit Härter 1

Die Verwendung von entstabilisiertem Technovit 9100 (Al_2O_3) garantiert, dass durch vorzeitig entstehende Radikale die Polymerisierung verhindert oder extrem verlangsamt wird.

5. Infiltration: Bei der Infiltration kam ein Gemisch aus 750ml entstabilisiertem Technovit 9100 (Al_2O_3), 3g Technovit 9100 Härter 1 und 60g Technovit 9100 PMMA-Pulver zum Einsatz und wurde bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Das PMMA-Pulver wird verwendet, um eine deutliche Absenkung des Polymerisationsschrumpfes, eine Reduktion der frei werdenden Polymerisationswärme und einen besseren Polymerisationsablauf zu gewährleisten.

6 .Polymerisierung: Die Polymerisation wird unter Sauerstoffausschluss und bei Temperaturen um den Gefrierpunkt (-2°C bis -15°C) durchgeführt. Somit ist zum einen die chemische Polymerisation und zum anderen die Ableitung der Polymerisationswärme gewährleistet. Die gekühlten Stammlösungen A (107g Technovit 9100 PMMA Pulver, 670 ml entstabilisiertem Technovit 9100 (Al_2O_3) , 4g Technovit 9100 Härter 1) und B (8 ml Technovit Härter 2, 4,4 ml Technovit 9100 Polymerisationsregler, 100ml entstabilsiertem Technovit 9100 (Al_2O_3) werden unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 9 Teile Stammlösung A und 1 Teil Stammlösung B in Braungefäßen gemischt. Die infiltrierten Proben werden für 10 Minuten unter Vakuum entgast und anschließend mit dem Polymerisationsgemisch in eine Einbettform gegeben. Danach kommen die infiltrierten Proben bei -4°C bis -6°C in den Kühler und polymerisieren dort durch.

6.5.2 Schritt 2 - Trimmen unter Wasserzufuhr

Nach Abschluss der Polymerisation wird der nun entstandene Block soweit vom Polymerisat entfernt, sodass der Schnitt noch von allen Seiten eingebettet ist. Mit einem Objektträger wird vor Abschluss noch geprüft ob der Block und in Breite und Länge übersteht.

6.5.3 Schritt 3 – Schnitte auf Kunststoff Objektträger kleben und Grinden (Schleifen)

Als Kleber wird Technovit 4000/4002 1-Komponentenliquid gemischt mit Technovit 4000 Pulver verwendet. Die Mischung muss gut und schnell gemischt werden und sollte eine zähflüssige Konsistenz haben, da sich sonst die Proben nicht auf dem Objektträger fixieren lassen.
Von diesem Gemisch wird eine kleine Menge unter das Präparat und auf den Kunststoff Objektträger gegeben. Die Trocknungsdauer beträgt 5-10 Minuten.
Nun wird der Präparatblock auf die zu untersuchende Ebene geschliffen. Erst wird der Block grob mit Schleifpapier der Körnung 320 bis kurz vor der Untersuchungsregion geschliffen. Danach mit Schleifpapier der Körnung 1000 für weitere 2 Minuten reduziert. Der Block wird nun mit einem Glas Objektträger abgeklebt und so zum Sägen vorbereitet.

6.5.4 Schritt 5 - Aufbringen auf silanisierte Objektträger

Anschließend wurden alle Proben durch eine Präzisionsklebepresse (Exakt Apparatebau GmbH, D-22851 Norderstedt) mittels Acrylzement (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) auf silanisierte Objektträger (Super Frost, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) aus Glas geklebt.

6.5.5 Schritt 4 – Sägen

Die Diaphysen der Schienbeine wurden mittels einer diamantierten Bandsäge (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Germany) transversal geschnitten. Die Schnitte erfolgten senkrecht zur Längsachse des Knochens direkt unterhalb der Epiphyse absteigend bis zur

Mitte der Diaphyse unterhalb des mit dem kortikalen Knochendeckel verschlossenen Defektes mit dem Ergebnis von annähernd 200 Mikrometer dicken Schnitten.

6.5.6 Schritt 5 - Grinden und polieren

Die gesägten Schnitte werden im nächsten Schritt mit einem Schleifpapier der Körnung 320 auf eine Stärke von ca. 120 Mikrometer heruntergeschliffen. Die Schnittendhöhe von ca. 20 Mikrometer wird mit einem Schleifpapier der Körnung 1000 erreicht. Auf der finalen Probenstärke werden diese 4 Minuten poliert und können anschließend gefärbt werden.

6.5.7 Schritt 6 - Immunhistochemische Anfärbung

Vor der immunhistochemischen Anfärbung werden die Proben getrocknet

6.6 Histomorphometrische Analyse

Die histomorphometrische Analyse sowie die mikroskopische Begutachtung wurden durch erfahrene Untersucher durchgeführt, denen die spezifischen Hintergründe des Experiments vorenthalten wurden. Zur Bildgebung wurde eine an ein Lichtmikroskop (Olympus BX50, Olympus, Germany) angebrachte CCD-Kamera (Color View III, Olympus, Germany) verwendet. Die digitalen Bilder wurden (in 200-facher Vergrößerung) mittels einer Software (CellD®, Soft Imaging System, Münster, Germany) ausgewertet.

Zur Analyse wurde jeweils 6 Schnitte der Proben aus der Versuchsgruppe (nach 4 und 8 Wochen) und der Kontrollgruppe (nach 4 und 8 Wochen) ausgewählt, welche die gesamte Dimension des Defektes repräsentieren. Insgesamt wurden somit 24 Schnitte untersucht und nach folgenden histomorphometrischen Parametern untersucht:

- Defektgröße (Defect Size; DS)
- Mineralisiertes Gewebe (Mineralized Tissue; TS)
- Nicht-mineralisiertes Gewebe (Non-Mineralized Tissue; NMT)
- Residuen der öligen Calciumhydroxid-Suspension im Defekt (residual OCHS)

Des Weiteren wurden die Reintegration des kortikalen Knochendeckels und die Knochenneubildung in der Nähe des Defektes beurteilt.

7 Ergebnisse

7.1 Klinische Heilungsphase

Die postoperative Heilungsphase verlief bei allen vier Minischweinen ohne Besonderheiten. Es wurden weder Allergien noch Fremdkörperreaktionen während der gesamten Studie beobachtet. Alle Wunden heilten komplikationslos und es zeigten sich keine Zeichen einer Entzündung oder Infektion. Nach einer Woche wiesen alle behandelten Seiten einen kompletten Wundverschluss ohne Anzeichen einer lokalen Gewebereaktion auf.

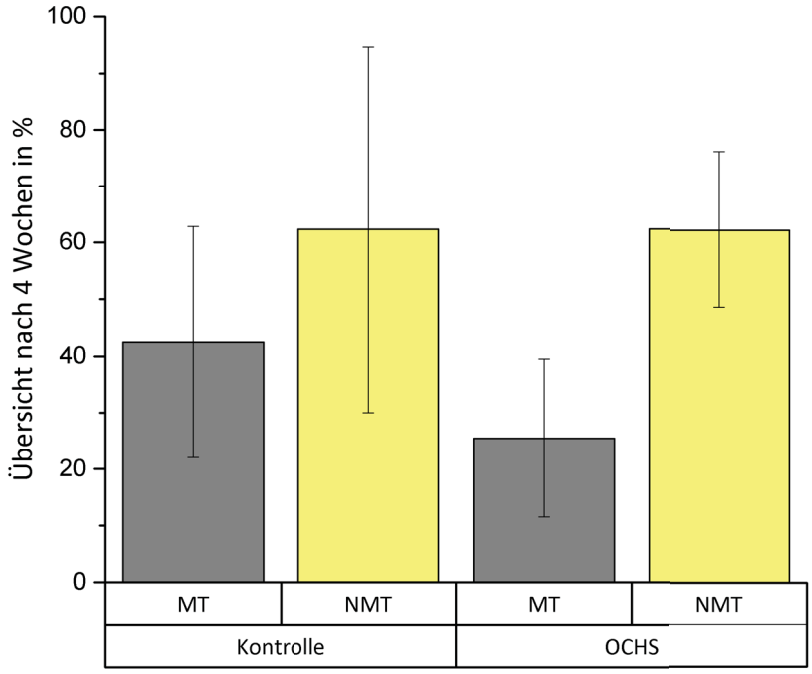
7.2 Histologische Evaluation

7.2.1 Histologische Evaluation nach 4 Wochen

Nach 4 Wochen zeigten die Schnitte sowohl aus der Versuchsgruppe als auch der Kontrollgruppe einen durch neu formierten trabekulären Knochen gut reintegrierten kortikalen Knochendeckel. In einigen Schnitten beider Gruppen konnte um den Knochendeckel herum, auf der zum Defekt abgewandten Seite in der Nähe der vorher angebrachten Osteosyntheseplatte, eine exzessive Knochenneubildung beobachtet werden. Jedoch enthielten auch beide Gruppen Schnitte mit nicht mineralisierten Defektspalten.
Die Gewebereaktionen in der Versuchs- und Kontrollgruppe waren gekennzeichnet durch die Bildung von neuem Knochen in direkter Nähe der Defektränder. Dort zeigte sich trabekulärer Knochen unterstützt durch ein zum Zentrum des Defektes orientiertes feines Gerüst aus neu formierten Knochenbälkchen. Allerdings waren die Defektzentren beider Gruppen von nicht mineralisiertem Gewebe dominiert. In den Proben der Versuchsgruppe wurden nur geringe Mengen an Resten öliger Calciumhydroxid-Suspension umgeben von einer Schicht mineralisiertem Gewebe nachgewiesen. Der durchschnittliche Anteil an mineralisiertem Gewebe betrug in der Versuchsgruppe 23,01% und in der Kontrollgruppe 43,45%. Der durchschnittliche Anteil an verbliebener öliger Calciumhydroxid-Suspension lag nach 4 Wochen bei 7,11%. Nach einer Heilungsphase von 4 Wochen konnten keine signifikanten Vorteile gegenüber der Kontrollgruppe belegt werden.

Gruppe		Durchschnitt	Standartabweichung	Median
4 Wochen OCHS	NMT	69,88	10,91	70,16
	MT	23,01	15,32	26,44
	OCHS	7,11	5,5	6,24
4 Wochen Kontrollgruppe	NMT	56,55	13,12	60,88
	MT	43,45	13,53	39,12

Tab. 11: Durchschnittliche Werte, Standartabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT, MT und OCHS in der Testgruppe sowie NMT und MT in der Kontrollgruppe nach 4 Wochen



Graphik 1: Vergleich der Kontrollgruppe und Versuchsgruppe OCHS nach 4 Wochen in Bezug auf NMT und MT

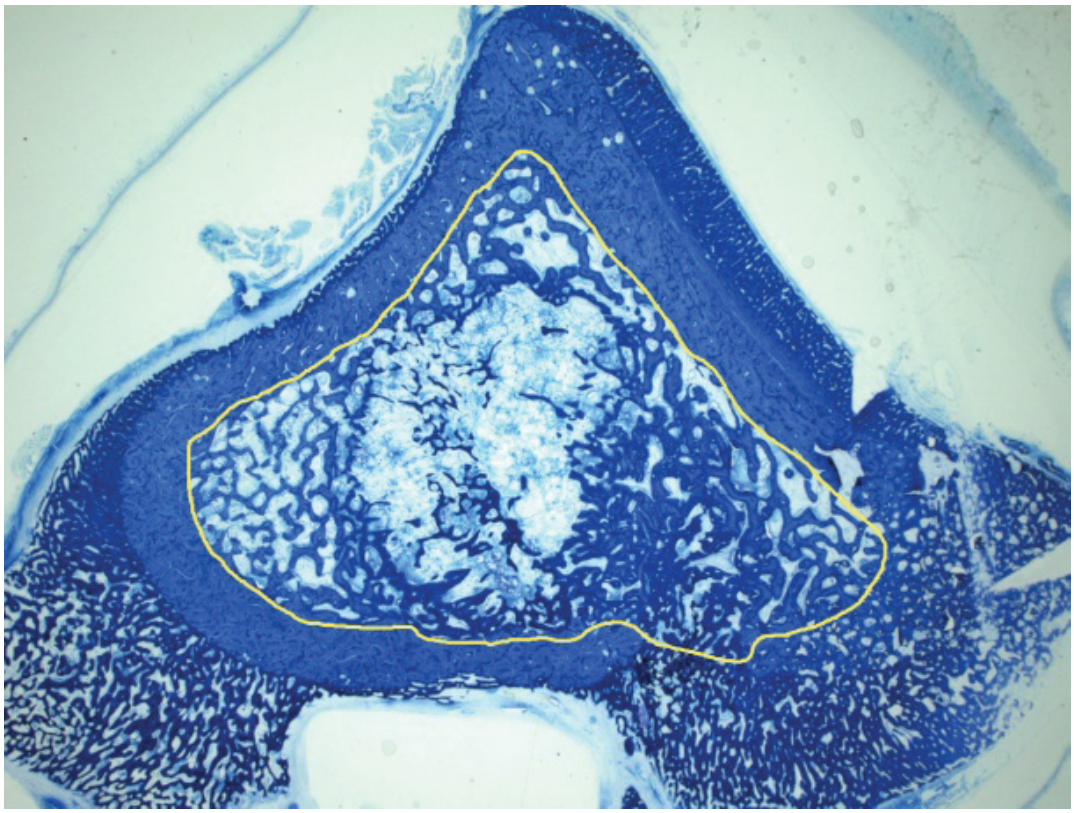


Abb. 2: ROI (Range of Interest)

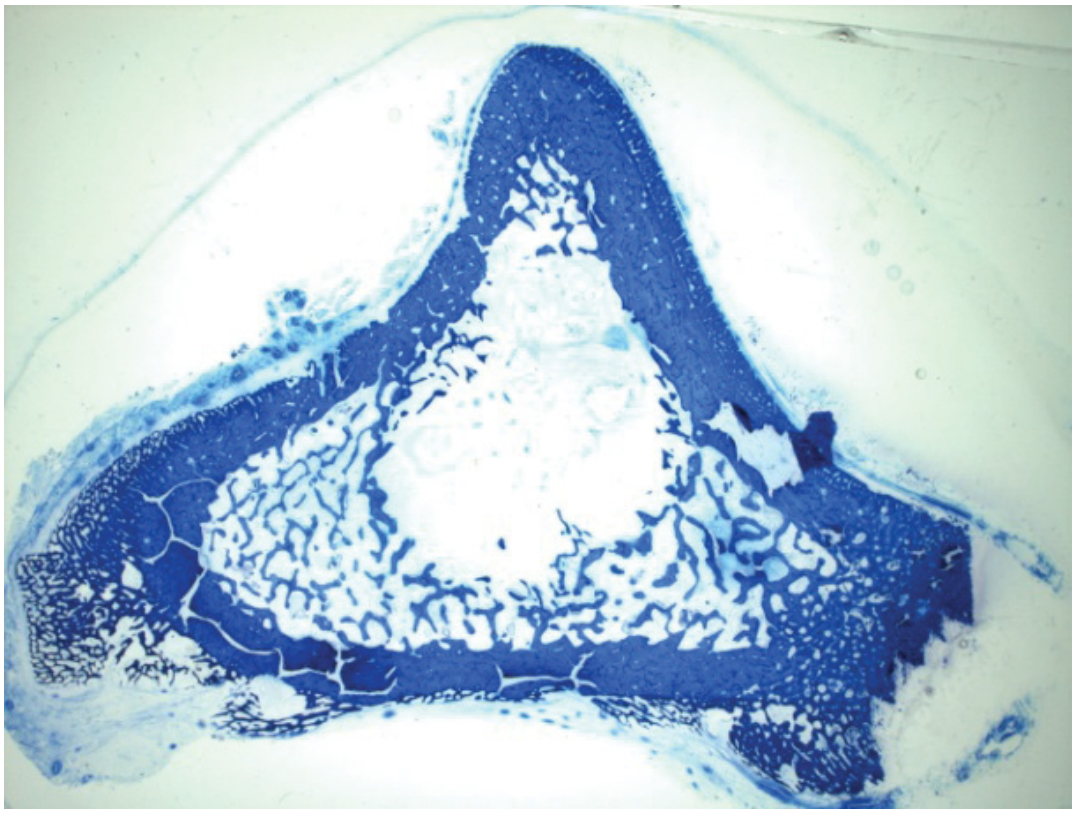


Abb. 3 a: Versuchsgruppe nach einer Heilperiode von 4 Wochen

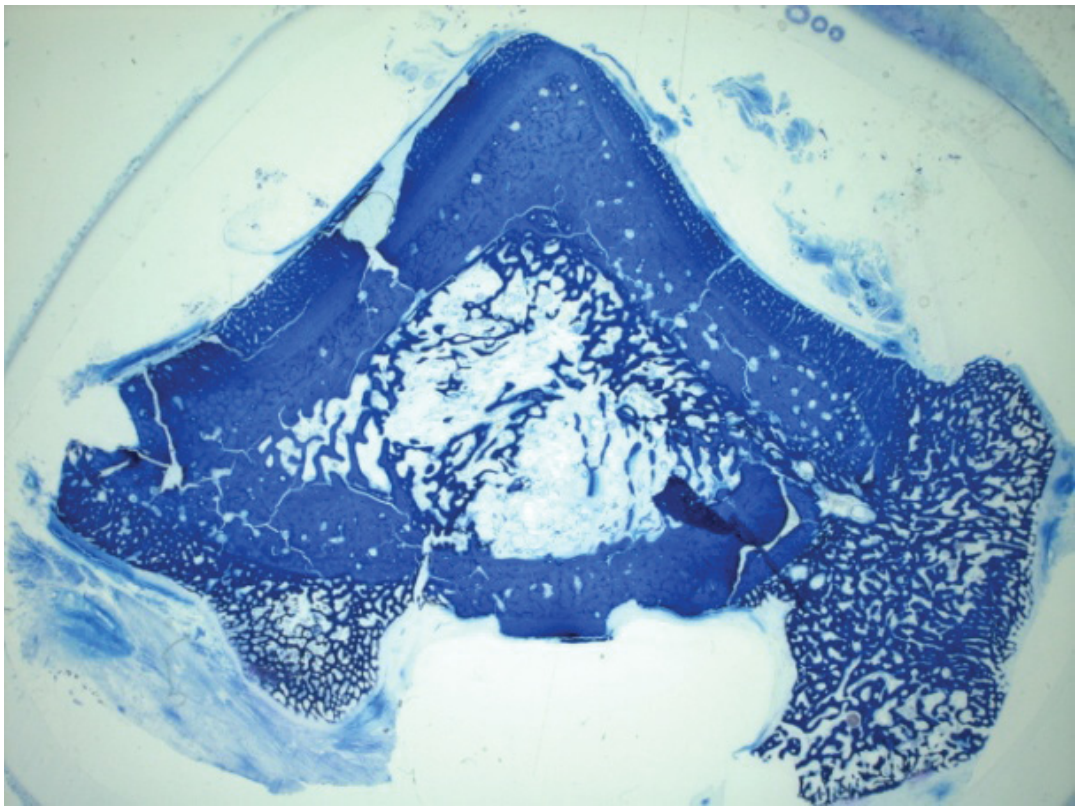


Abb. 3 b: Kontrollgruppe nach einer Heilperiode von 4 Wochen

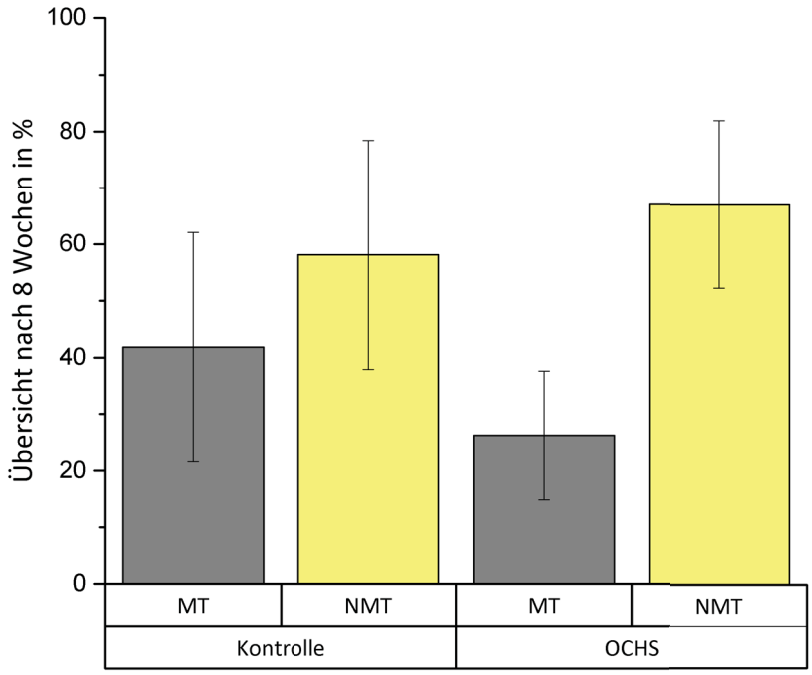
7.2.2 Histologische Evaluation nach 8 Wochen

Nach 8 Wochen konnte in beiden Gruppen zum einen die Umwandlung des neu gebildeten Knochens in der Umgebung der Defektränder in Geflechtknochen beobachtet werden und zum anderen ein Fortschreiten der Knochenneubildung in Richtung Defektzentrum. Bezüglich der Knochenneubildung im Bereich des Knochendeckels konnten keine Unterschiede zur vorigen Evaluation nachgewiesen werden. Die Schnitte beider Gruppen zeigten ein Fortschreiten der Knochenneubildung ausgehend von den Defekträndern in Richtung des Defektzentrums. Zahlreiche Proben beider Gruppen hatten in der Umgebung der früheren Defektränder ein dichtes Netzwerk aus trabekulären Strukturen umgeben von einer soliden Schicht aus Geflechtknochen. Im Gegensatz dazu konnte nur in wenigen Schnitten, sowohl in der Versuchsgruppe als auch in der Kontrollgruppe, eine dichte Verknöcherung des Defektzentrums belegt werden. Vergleicht man beide Gruppen, scheint die Menge an mineralisiertem Gewebe, insbesondere im Zentrum des Defektes, in der Kontrollgruppe höher zu sein als in der Versuchsgruppe mit OCHS. Die Menge an

mineralisiertem Gewebe ist in beiden Gruppen nur unwesentlich in der Heilungsphase zwischen 4 und 8 Wochen angestiegen. Der durchschnittliche Anteil an mineralisiertem Gewebe betrug in der Versuchsgruppe 28,15% und in der Kontrollgruppe 44,39%. Der durchschnittliche Anteil an verbliebener Calciumhydroxid-Suspension lag bei 7,05%. Nach einer Heilungsphase von 8 Wochen konnten keine signifikanten Vorteile gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Gruppe		Durchschnitt	Standartabweichung	Median
8 Wochen OCHS	NMT	64,80	16,19	71,19
	MT	28,15	12,45	22,25
	OCHS	7,05	6,66	4,61
8 Wochen Kontrollgruppe	NMT	55,61	23,19	61,26
	MT	44,39	22,27	38,75

Tab. 12: Durchschnittliche Werte, Standartabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT, MT und OCHS in der Versuchsgruppe sowie NMT und MT in der Kontrollgruppe nach 8 Wochen



Graphik 2: Vergleich der Kontrollgruppe und Versuchsgruppe OCHS nach 8 Wochen in Bezug auf NMT und MT

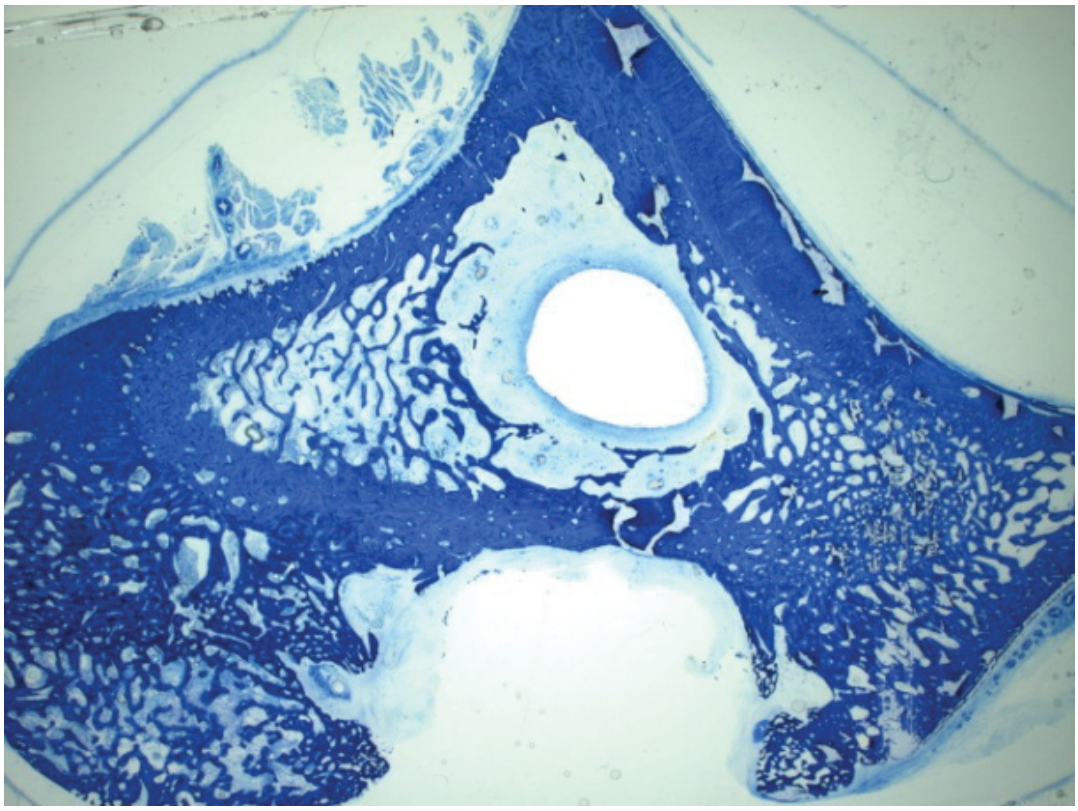


Abb. 4 a: Versuchsgruppe nach einer Heilperiode von 8 Wochen

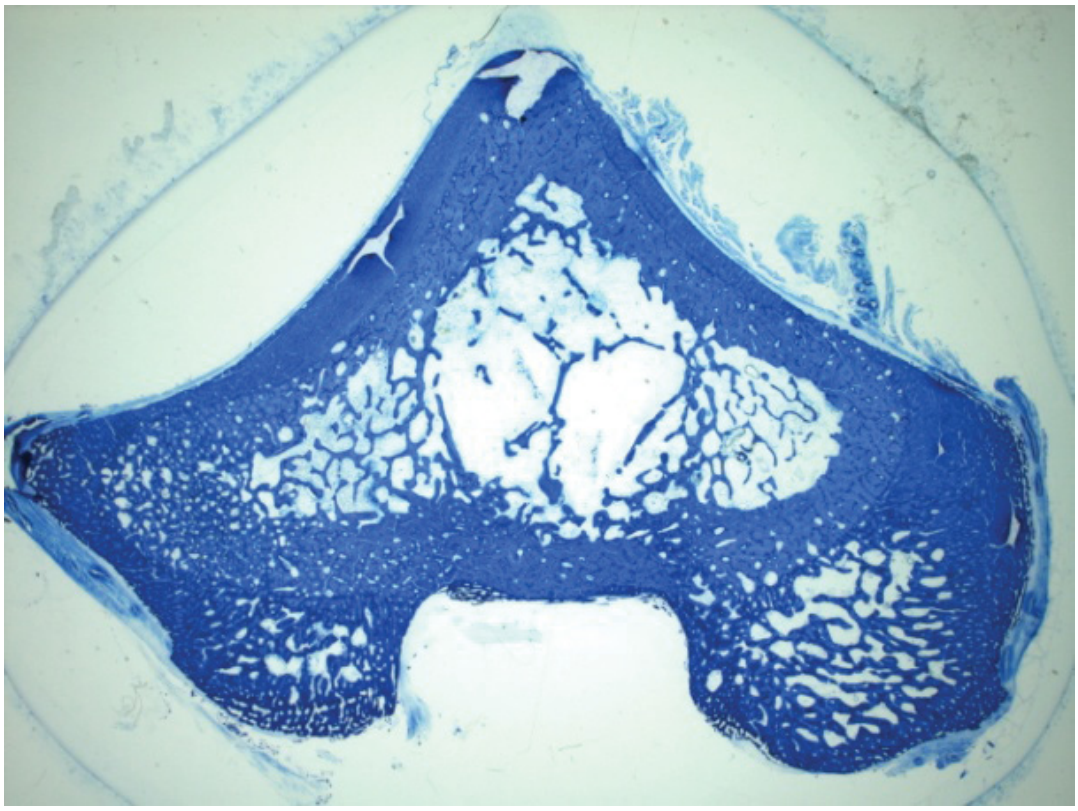
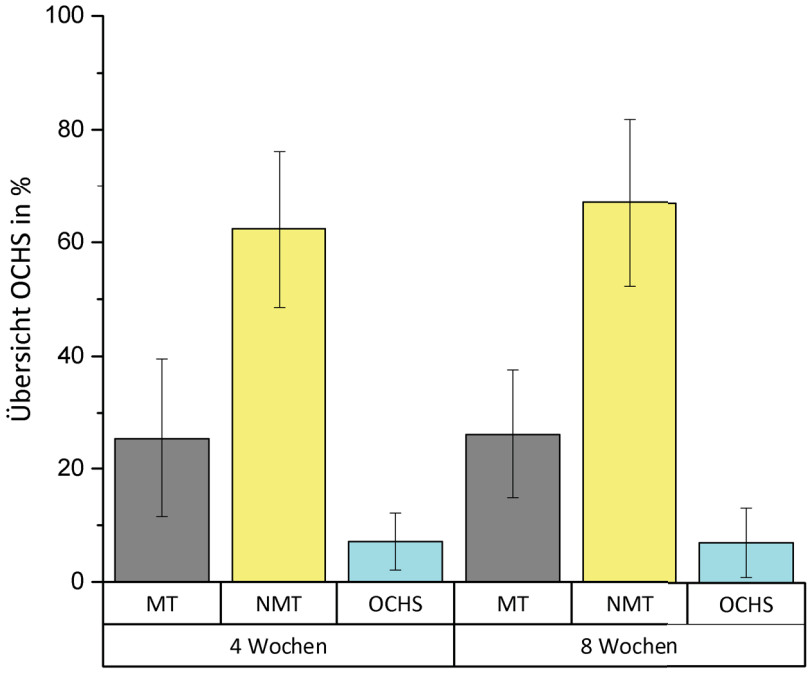


Abb. 4 b: Kontrollgruppe nach einer Heilperiode von 8 Wochen

7.2.3 Vergleich 4 und 8 Wochen nach histologischer Evaluation

Gruppe		Durchschnitt	Standardabweichung	Median
4 Wochen	NMT	69,88	10,91	70,16
	MT	23,01	15,32	26,44
	OCHS	7,11	5,5	6,24
8 Wochen	NMT	64,80	16,19	71,19
	MT	28,25	12,45	22,25
	OCHS	7,05	6,66	4,61

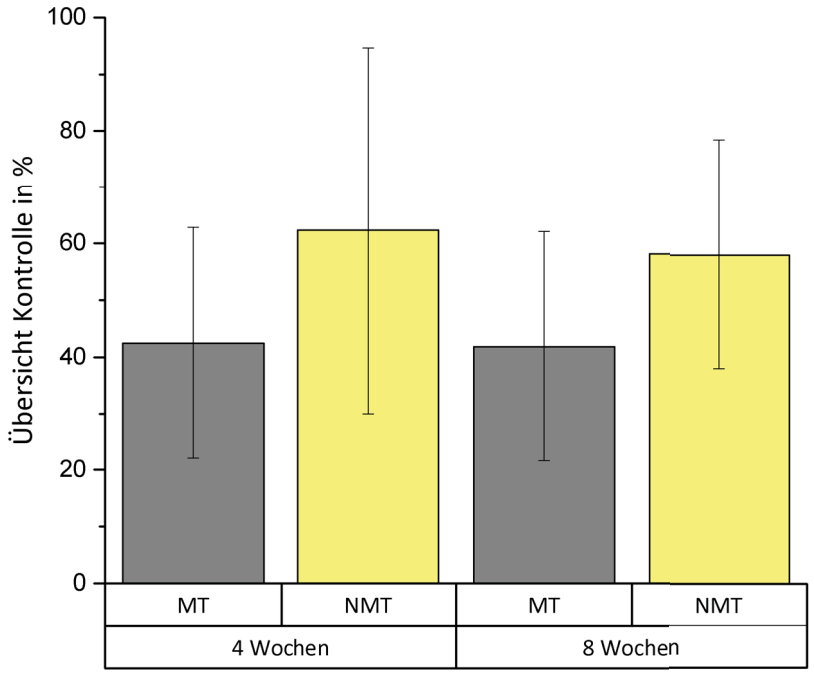
Tab. 13: Durchschnittliche Werte, Standardabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT, MT und OCHS in der Versuchsgruppe



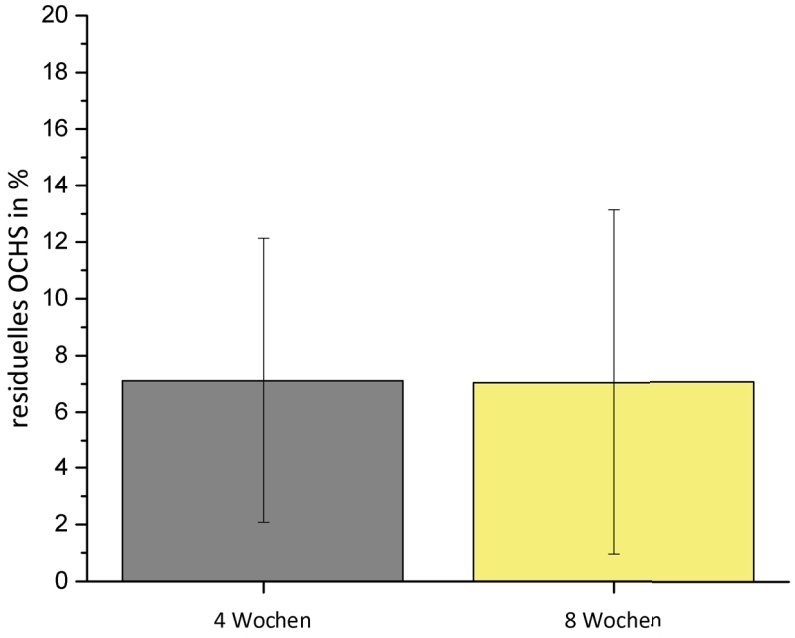
Graphik 3: Übersicht MT, NMT und residuelles OCHS in Prozent nach 4 und 8 Wochen (Versuchsgruppe)

Gruppe		Durchschnitt	Standardabweichung	Median
4 Wochen	NMT	56,55	13,12	60,88
	MT	43,45	13,53	39,12
8 Wochen	NMT	55,61	23,19	61,26
	MT	44,39	22,27	38,75

Tab. 14: Durchschnittliche Werte, Standardabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT und MT in der Kontrollgruppe



Graphik 4: Übersicht MT und NMT in Prozent nach 4 und 8 Wochen (Kontrollgruppe)



Graphik 5: Residuelles OCHS in Prozent nach 4 und 8 Wochen

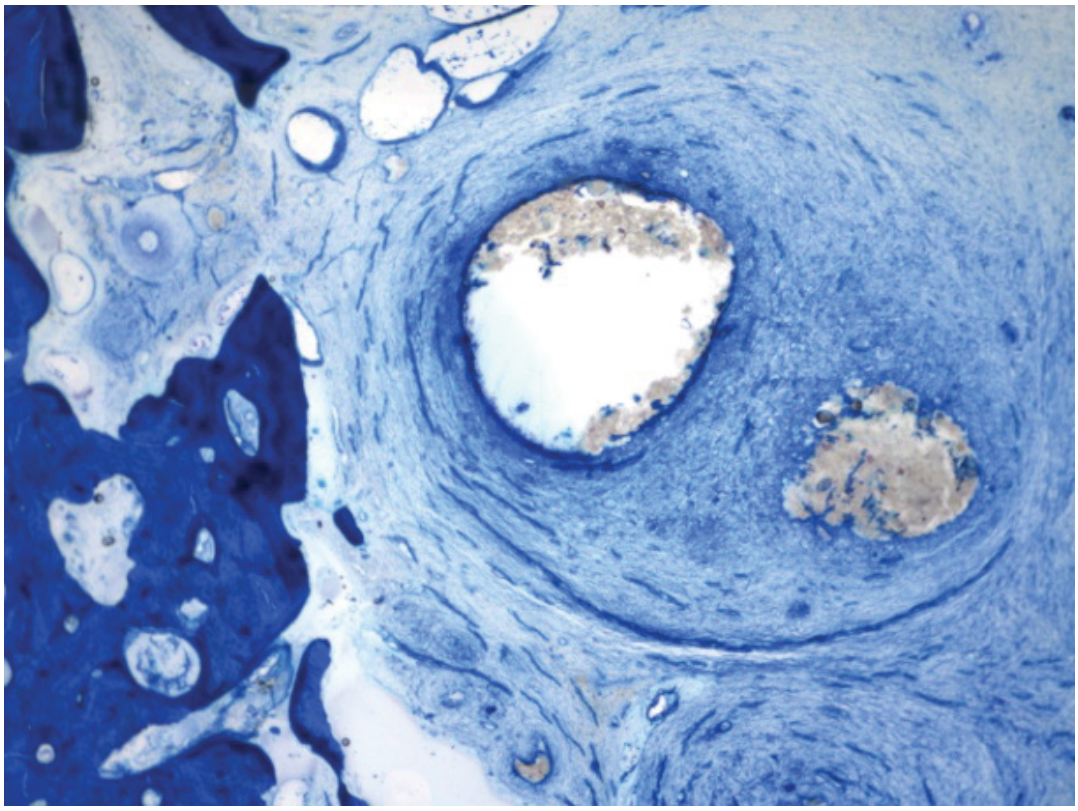


Abb. 5: Residuelles OCHS umgeben von mineralisiertem Knochengewebe

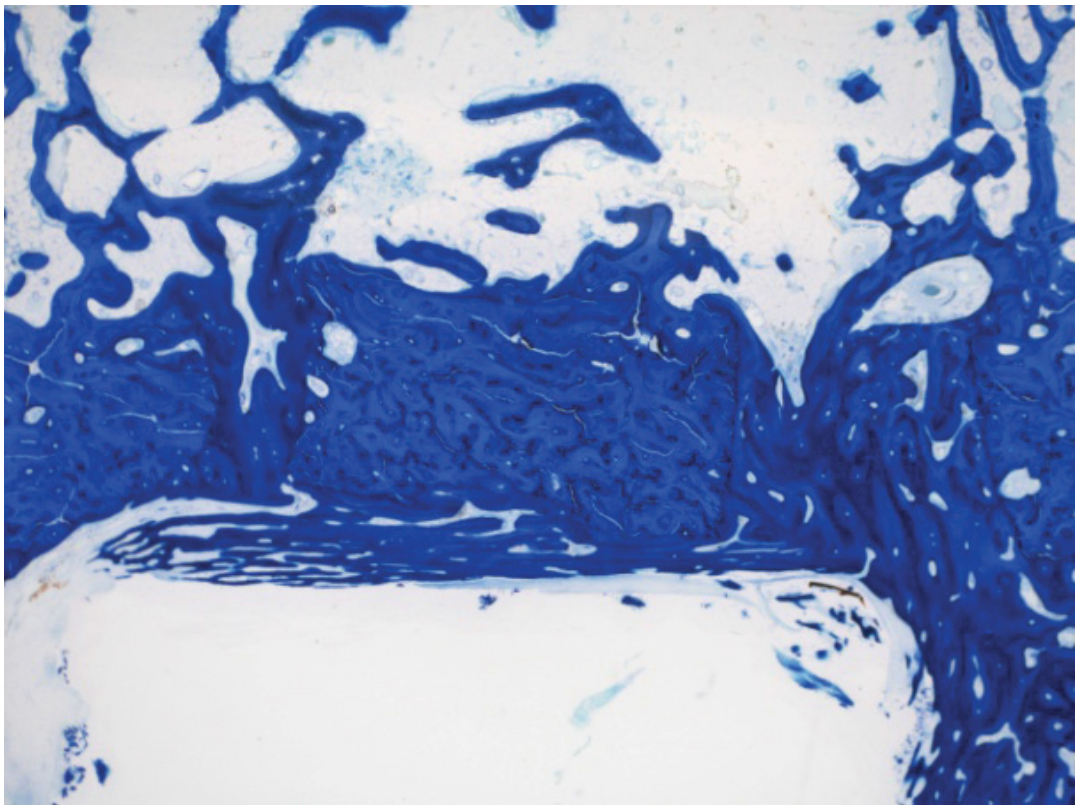


Abb. 6 a: Beide Gruppen zeigten eine gute Reintegration des Knochendeckels durch neu gebildeten trabekulären Knochen (Versuchsgruppe)

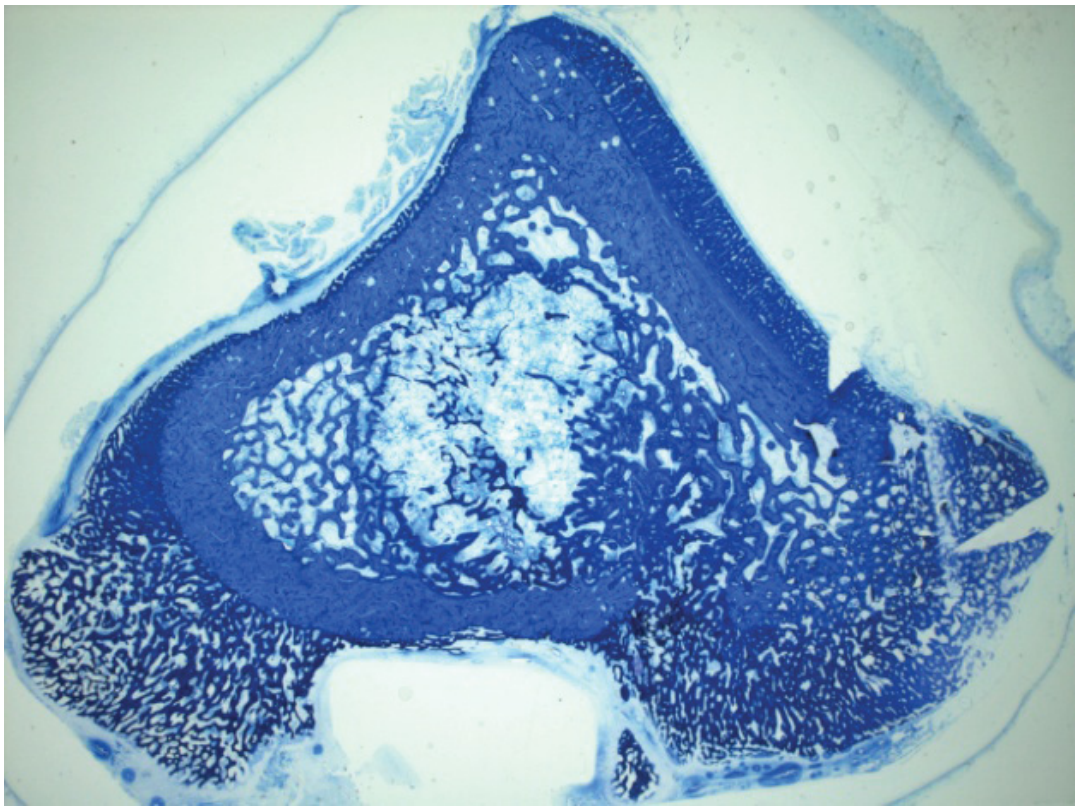


Abb. 6 b: Exzessive Knochenneubildung um den Knochendeckel auf der zum Defekt abgewandten Seite in der Nähe der vorher angebrachten Osteosyntheseplatte (Versuchsgruppe)

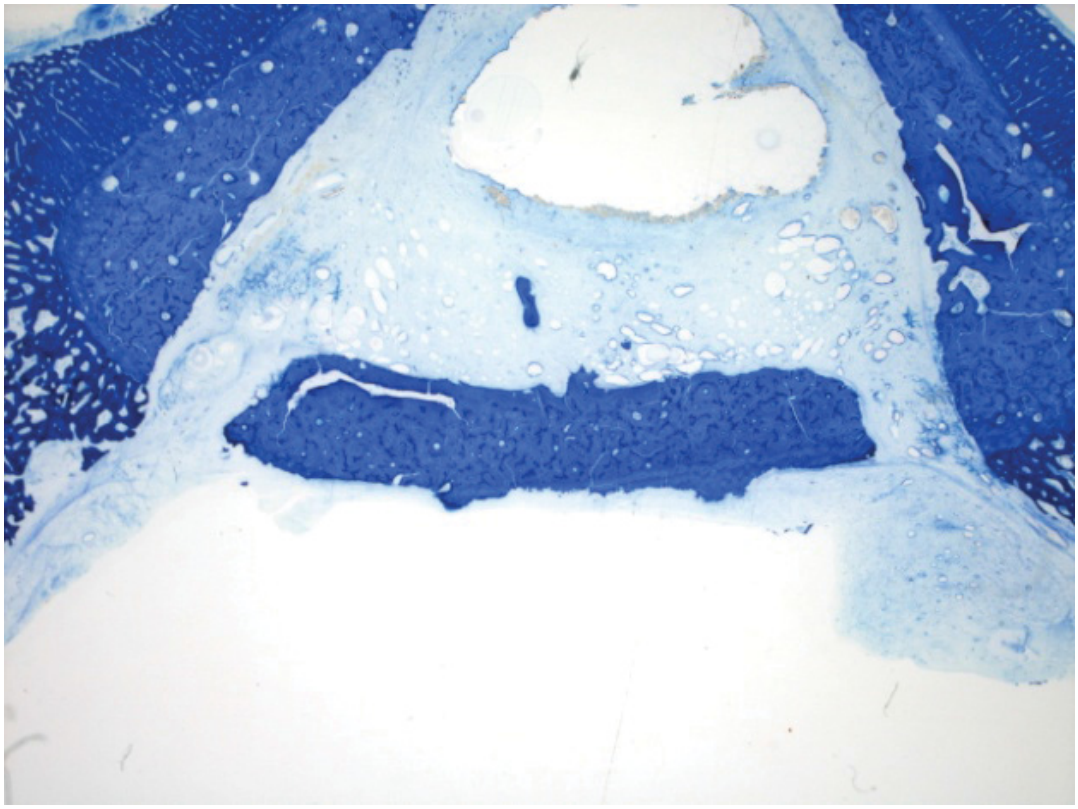
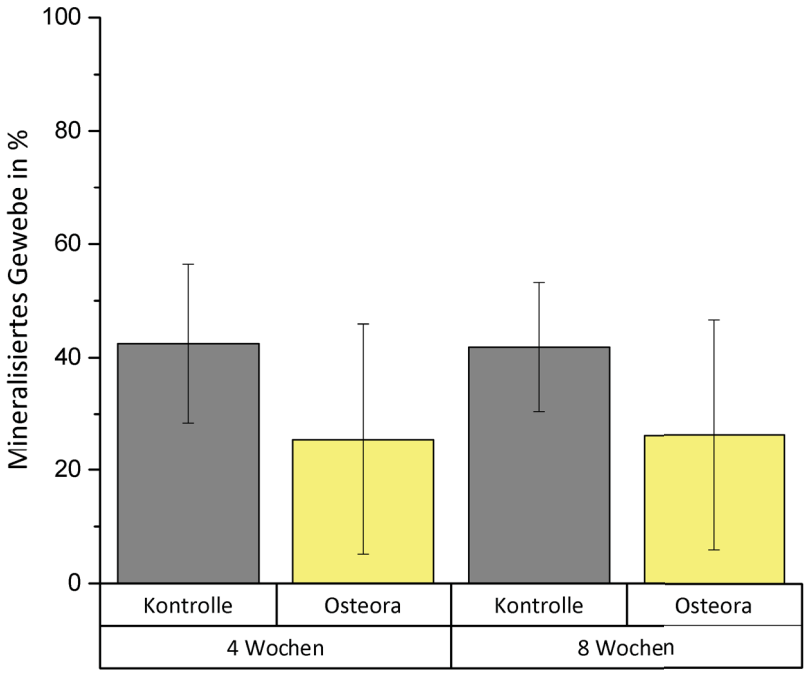


Abb. 6 c: Schnitt mit deutlich zu erkennenden nicht mineralisierten Defektspalten (Kontrollgruppe)



Graphik 6: Vergleich MT Kontrollgruppe versus Versuchsgruppe OCHS nach 4 und 8 Wochen

8 Diskussion

Die Regeneration und Rekonstruktion von Knochendefekten des Kieferkammes zur Sanierung mit enossalen dentalen Implantaten stellt immer noch eine große Herausforderung dar und erfordert anspruchsvolle Operationsverfahren. Die Transplantation von autogenen, allogenen oder alloplastischen Knochenersatzmaterialien sowie die Distraktionsosteogenese sind routinemäßig verwendete Techniken zur Rekonstruktion von Knochendefekten des Kieferkammes. Jeder dieser Eingriffe hat jedoch spezifische Einschränkungen in Bezug auf Verfügbarkeit, Immunogenität oder biomechanische Stabilität. Insbesondere die Applikation morphogenetischer und mitogener Wachstumsfaktoren und deren Wirkung auf die Knochenneubildung wurden in verschiedenen Studien untersucht [2, 3]. Es konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass knochenmorphogenetische Proteine (BMP) oder Wachstumsfaktoren wie GDF-5 (Growth/Differentiation Factor 5) und PDGF (Plateled-Derived Growth Factor) eine stimulierende Wirkung auf das lokale Knochenwachstum haben [3, 89, 90]. Die Möglichkeit der Osteopromotion und Osteoinduktion durch Knochenersatzmaterialien rückt daher immer mehr in den Fokus der Forschung. Ein vielversprechender Ansatz war vor einigen Jahren der Einsatz öliger Calciumhydroxid-Suspension (OCHS) zur Regeneration von Knochengewebe. Erstmalig verwendet von Hermann um 1920 als direktes Capping-Material der Pulpa [91] hat CH im Laufe der Jahre ein immer größeres Spektrum an Indikationen bekommen. Beispiele hierfür sind direktes und indirektes Capping von Pulpagewebe, Verwendung bei Apexfixation und Apexogenese, als antibakterielles und antiinflammatorisches temporäres Füllungsmaterial bei Wurzelkanalbehandlungen oder zur Behandlung von periapikalen Läsionen [75]. Es konnte in verschiedenen experimentellen Studien beobachtet werden, dass Calciumhydroxid (CH) antimikrobielle [5, 6] und antiinflammatorische [7] Eigenschaften besitzt. In Untersuchungen von Tepel et al. und Holland et al. wurde die Formation von Hartgewebe im Bereich der Wurzelkanalöffnung beobachtet, nachdem CH in den Wurzelkanal nahe der Wurzelspitze appliziert worden war. Durch die stark alkalischen Eigenschaften kam es zunächst zu einer Zerstörung von vitalem Gewebe mit nachfolgender Bildung einer nekrotischen Schicht und schließlich zur Bildung von Hartgewebe [92, 93]. Des Weiteren scheint CH auch einen positiven Einfluss auf die

Heilung von periapikalen Defekten zu haben [8, 9]. Diese Effekte beruhen hauptsächlich auf den stark alkalischen Eigenschaften von CH und der Dissoziation in Calcium- und Hydroxylionen, wenn CH in Kontakt mit Wasser tritt. Durch die Freisetzung von Hydroxylionen kommt es zu einer Zerstörung der bakteriellen cytoplasmatischen Membran, Proteindenaturation und Schädigung der bakteriellen DNA und somit zu einer antibakteriellen Wirkung [73]. Der fördernde Effekt auf die Mineralisation von Hartgewebe ist durch den hohen pH-Wert bedingt. Dieser wirkt neutralisierend auf saure Metaboliten von Makrophagen und Bakterien, aktivierend auf die alkalische Phosphatase von Osteoblasten und verstärkend auf die metabolische Aktivität von osteoformativen Zellen [16]. Roecher et al. und Dietz et al. beobachteten in ihren In-vitro-Studien an humanen vitalen Knochenzellen, dass CH einen stimulierenden Effekt auf Differenzierung, Wachstum und Metabolismus von Osteoblasten besitzt [76, 77]. Weiterhin stellte die Arbeitsgruppe um Roecher einen positiven Effekt von CH auf 15 biochemische Parameter der Knochenregeneration fest [76]. Kasaj et al. fanden heraus, dass durch die Applikation von OCHS die mitogene Reaktion von humanen Parodontoligament-(PDL-)Zellen durch Aktivierung von extrazellulär regulierten Kinasen (ERK 1/2) verstärkt wird und die Zellproliferation zunimmt [15]. Die Erkenntnisse im Hinblick auf die knochenregenerativen Eigenschaften in vivo sind allerdings eher gering und nicht unumstritten [13, 14]. In der vorliegenden Studie wurde daher die Applikation einer öligen Calciumhydroxid-Suspension (OCHS) in artifiziell geschaffenen Knochendefekten der Tibia am Göttinger Minischwein untersucht. Besonderes Augenmerk erhielten dabei die Knochenneubildung im Bereich der Defekte und die Biodegradierbarkeit von OCHS. Ein standardisierter Defekt (2 cm x 1,5 cm) wurde in der Testgruppe mit OCHS und in der Kontrollgruppe mit Eigenblut wieder aufgefüllt und anschließend mit einem Knochendeckel verschlossen. Nach 4 bzw. 8 Wochen fand die Opferung der Versuchstiere mit nachfolgender histomorphometrischer und histologischer Auswertung der zu untersuchenden Defekte statt. In diesem Versuchsmodell konnte gezeigt werden, dass die Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Vorteil bei der Knochenregeneration aufweist. Qualität und Quantität der Knochenneubildung in den mit OCHS aufgefüllten Defekten waren tendenziell geringer als in der Kontrollgruppe mit Eigenblut. Diese Beobachtungen könnten in Zusammenhang mit dem gewählten Versuchsmodell stehen. Das geschlossene Versuchsmodell stellt durch die spongiöse Umgebung des tibialen Knochenmarks und mit dem Vorhandensein von

pluripotenten Vorläuferzellen eine ideale Umgebung für die spontane Knochenregeneration dar – perfekte Voraussetzungen also für die natürliche Knochenregeneration der Kontrollgruppe [94, 95].

In der Testgruppe könnte die Applikation von OCHS eine hemmende Wirkung auf die frühe Wundheilung haben, da die Ausbildung eines Defekthämatoms durch Anwesenheit von OCHS nicht vollständig möglich ist. Die Annahme, dass es zu einer Hemmung der Neoangiogenese durch OCHS kommt, steht in Übereinstimmung mit anderen experimentellen Studien, in denen die Wirkung von OCHS ebenfalls in geschlossenen Versuchsmodellen bei Ratten und Hunden untersucht wurde. In den Arbeiten von Stavropoulos et al. und Busenlechner et al. wurde eine Hemmung der Angiogenese in Kombination mit geführter Knochenregeneration beobachtet (Guided Bone Regeneration, GBR) [13, 14]. Stavropoulos et al. untersuchten die Wirkung von OCHS in Kombination mit geführter Knochenregeneration in einem Tiermodell bei Ratten. Hier konnte gezeigt werden, dass OCHS in diesem Versuchsmodell die Formation von Knochengewebe nicht fördert. Die Kontrollgruppe ohne OCHS zeigte statistisch signifikant größere Mengen an neu formiertem Knochengewebe. In den Defekten, welche zusätzlich mit OCHS behandelt wurden, konnten nur minimale Mengen an neu formiertem Knochengewebe nachgewiesen werden. Weiterhin wurde beobachtet, dass es praktisch zu keiner Resorption des Materials gekommen ist. Gründe für die sehr geringe Biodegradierbarkeit sieht die Arbeitsgruppe in der kompromittierenden Blutversorgung und der damit einhergehenden Störung in der frühen Wundheilungsphase [13]. Die Arbeitsgruppe um Busenlechner führte eine Studie durch, in der verschiedene Knochenersatzmaterialien kombiniert mit geführter Knochenregeneration in vivo verglichen wurden. Zum Einsatz kamen hier Bio-Oss, ein deproteiniertes bovines KEM, Ostim, eine wässrige Suspension von Hydroxylapatit und Osteoinductal, OCHS. Auch hier kam es zu keiner Formation von neuem Knochengewebe durch OCHS. Es wurden vielmehr eine Resorption des Knochens und eine Einkapselung des Materials durch fibröses Gewebe beobachtet [14]. In der aktuellen Studie konnte dies nicht bestätigt werden. Die histologische Auswertung nach 4 Wochen zeigte eine deutliche Resorption des Knochenersatzmaterials mit einem durchschnittlichen Rest von 7,11% OCHS. Nach 8 Wochen konnte mit einem Wert von durchschnittlich 7,05% residuellem OCHS keine weitere statistisch signifikante Degradierung festgestellt werden.

Die Hemmung der Knochenregeneration, welche Stavropoulos et al. und Busenlechner et al. in ihren Studien mit geschlossenen Versuchsmodellen gefunden haben, konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht bekräftigt werden. Bei allen Versuchstieren wurde nach 4 und 8 Wochen neu formiertes Knochengewebe in der histologisches Auswertung nachgewiesen, jedoch zeigten die Tiere aus der Versuchsgruppe deutlich geringere Mengen an mineralisiertem Gewebe. Während die Mengen an mineralisiertem Gewebe in der Kontrollgruppe zwischen den Auswertungen in Woche 4 und 8 nur geringfügig größer geworden sind, konnte in der Versuchsgruppe eine deutlich Zunahme von 23,01% auf 28,15% beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass OCHS lediglich in der ersten Phase der Wundheilung und in diesem speziellen Defektmodell einen hemmenden Effekt auf die Formation von neuem Knochengewebe besitzt. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Ito von 2001. Dort wurde eine Studie an Ratten durchgeführt, in der die Heilung von Extraktionsalveolen gefüllt mit OCHS verglichen mit unbehandelten Extraktionsalveolen untersucht wurden. Die Tiere wurden nach Heilperioden von 4 und 8 Wochen geopfert. In der ersten Auswertung nach 4 Wochen konnten in der Testgruppe statistisch signifikant größere Mengen an neu formiertem Knochengewebe nachgewiesen werden, was die Autoren vermuten ließ, dass OCHS die postoperative Knocheninduktion beschleunigt. Die Beobachtungen nach 8 Wochen zeigten einen lediglich sehr geringen Unterschied zwischen den beiden Gruppen [96].

Der knochenregenerative Effekt von OCHS auf periodontale Defekte ist durch verschiedene Studien erforscht worden. In einer Arbeit von Schwarz et al. 2006 wurde die Behandlung von bilateral geschaffenen intraossären Periodontaldefekten im Hundemodell untersucht. Die Defekte wurden nach dem Zufallsprinzip entweder mit einer Lappenplastik und OCHS oder mit einer Lappenplastik ohne OCHS behandelt. Nach einer Heilperiode von 8 Wochen konnten histomorphometrisch größere Mengen von regeneriertem Knochen an den Versuchstieren nachgewiesen werden, welche zusätzlich OCHS appliziert bekamen. In der Kontrollgruppe war die Heilung überwiegend durch die Bildung von langem Saumepithel entlang der zuvor freigelegten Wurzeloberfläche gekennzeichnet. Die Regeneration von periodontalem Knochengewebe war nur geringfügig zu beobachten [10]. Stratul et al. untersuchten die Wirkung von OCHS auf tiefe intraossäre Defekte bei Patienten mit chronischer Parodontitis. Insgesamt wurden 30 Patienten nach dem Zufallsprinzip mit Access Flap Surgery (AFS) und OCHS oder alleinig durch Acces Flap Surgery behandelt. Es konnte

gezeigt werden, dass die PPD (Probing Pocket Depth) und CAL (Clinical Attachment Level) nach 6 Monaten bei beiden Therapien eine statistische signifikante Verbesserung aufwiesen. Ferner offenbarte die Behandlung durch AFS und zusätzlich OCHS statistisch signifikante Vorteile gegenüber einer alleinigen Behandlung mit AFS [12]. Die Behandlung intraossärer Defekte bei chronischer Parodontitis mit einer Kombination aus alpha-TCP und OCHS wurde ebenfalls von einer Arbeitsgruppe um Stratul untersucht. Es wurden insgesamt 14 Patienten mit dieser Kombination behandelt. Nach 6 Monaten konnte eine statistisch signifikante Verbesserung in der PPD und CAL erkannt werden [97]. Ob die beobachtete Regeneration auf eine osteoinduktive Wirkung zurückzuführen ist, bleibt offen. Die regenerativen Effekte von OCHS könnten auch auf dem antibakteriellen Effekt der Hydroxylionenkonzentration beruhen, bevor diese aus den Defekten ausgewaschen werden. Im Widerspruch zu den zuvor genannten Studien von Schwarz et al. und Stratul et al. berichten andere Arbeitsgruppen über keine fördernden Eigenschaften von OCHS in der Behandlung von knöchernen Defekte bei Parodontitis. In der Studie von Stavropoulos et al. wurde die Wirkung von OCHS auf die klinische und histologische Heilung von intraossären parodontalen Defekten untersucht. Insgesamt wurde bei 4 Patienten mit fortgeschrittenen intraossären 1- und 2-Wand-Defekten bei Parodontitis OCHS als Knochenersatzmaterial in den Defekt appliziert und anschließend mit einer Lappenplastik verschlossen. Nach 6 Monaten wurden die Zähne mit einem Teil des umgebenden Weich- und Hartgewebes entfernt und histologisch untersucht. Hier fiel die Knochenneubildung sehr gering aus oder fehlte völlig [98]. Aparna et al. verglichen die Behandlung von 30 Patienten mit fortgeschrittener chronischer Parodontitis. Nach dem Zufallsprinzip wurden die Patienten entweder mit Open Flap Surgery und OCHS oder nur mit Open Flap Surgery behandelt. Es konnte in keinem der gemessenen Parameter ein Vorteil für die Testgruppe beobachtet werden [99]. Ebenfalls keinen Vorteil für die Behandlung mit OCHS ergab die Studie um Amoian. Hier wurden 24 Grad-II-Furkationsdefekte bei chronischer Periodontitis in zwei Gruppen unterteilt. Die Testgruppe wurde mit einer Lappenplastik und OCHS behandelt, die Kontrollgruppe nur mit einer Lappenplastik [100].

Um zusätzliche Daten bezüglich der Gewebereaktion auf OCHS zu gewinnen, wurde die vorliegende Studie als induktiver Versuch in einem idealen spongiösen Umfeld umgeben von tibialem Knochenmark und pluripotenten Vorläuferzellen konzipiert. Die Auswertung der histologischen Schnitte ergab jedoch nur eine geringe Verstärkung des Zellmetabolismus und

der Zellreifung in Zusammenhang mit der Applikation von OCHS. Somit scheint es eine Diskrepanz zwischen den in Zellkulturen beobachteten Ergebnissen und den Befunden im Tiermodell zu geben. Über die Gründe hierfür kann nur spekuliert werden – einer könnte das Fehlen von Entzündungszellen sein, wie die Arbeitsgruppe um Kohal vermutete. In ihrer Studie wurde die Wirkung von OCHS auf den Heilungsprozess nach dem Setzen von enossalen dentalen Implantaten untersucht. Bei insgesamt 8 Beaglehunden wurden 48 Implantate gesetzt. Bei der Testgruppe wurde vor der Implantation OCHS in die Bohrlöcher appliziert, während bei der Kontrollgruppe ohne OCHS-Applikation implantiert wurde. Es wurden je 2 Hunde nach 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten geopfert und die Präparate histologisch und histomorphometrisch untersucht. Es zeigte sich gerade in der 1. und 2. Woche nach Implantation eine deutliche unspezifische Entzündungsreaktion mit Zerstörung des umliegenden Knochengewebes. Der Knochen-Implantat-Kontakt wies in den ersten beiden Beobachtungszeitpunkten keinen signifikanten Unterschied auf. Ab der 3. Woche bestand ein klinisch signifikanter Unterschied zugunsten der Kontrollgruppe ohne OCHS in Bezug auf den Knochen-Implantat-Kontakt. Die Autoren vermuten, dass der in vitro beobachtete positive Effekt auf die Knochenneubildung durch die Anwesenheit von Entzündungszellen in vivo nicht gewährleistet ist. Makrophagen sezernieren verschiedene Enzyme und Zytokine, welche differenzierend auf Vorläuferzellen von Osteoklasten wirken und so zum Knochenabbau führen [16]. Dennoch wird Calciumhydroxid klinisch erfolgreich in der Endodontie verwendet und es konnte ein unterstützender Effekt bei der Formation von knöchernem Gewebe in verschiedenen Indikationen belegt werden (z.B. als Dentin-Barriere, apikale Abdichtung, Apexfixation, Heilung periapikaler Läsionen) [75, 93]. Ferner konnten in experimentellen und klinischen Studien die regenerativen Eigenschaften von OCHS nach Applikation in Taschen parodontaler Defekte aufgezeigt werden [10, 12, 101]. Dies muss jedoch kritisch betrachtet werden, da in den Arbeiten von Stavropoulos et al., Aparna et al. und Amoian et al. kein Vorteil der Therapie von periodontalen Defekten durch die zusätzliche Applikation von OCHS beobachtet werden konnte [98-100].

In der vorliegenden Studie war nach einer Heilperiode von 4 und 8 Wochen der durchschnittliche prozentuale Anteil an mineralisiertem Gewebe in der Versuchsgruppe unterhalb von dem der Kontrollgruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, dass OCHS in geschlossenen Knochendefekten über eine gute Biokompatibilität verfügt und gerade in der ersten Phase gut resorbiert wird. Es konnte

sowohl in der Test- als auch in der Kontrollgruppe ein positiver Effekt auf die Knochenregeneration belegt werden, jedoch mit Vorteilen auf Seiten der Kontrollgruppe. Dies vermag mit dem hier gewählten Defektmodell zusammenhängen, welches ideale Voraussetzungen für die natürliche Knochenregeneration bietet. Ein Vorteil bei der Knochenregeneration mit OCHS konnte in dieser Studie somit nicht beobachtet werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG: **Animal models for implant biomaterial research in bone: a review**. *European cells & materials* 2007, **13**:1-10.
2. Jung RE, Glauser R, Scharer P, Hammerle CH, Sailer HF, Weber FE: **Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans**. *Clinical oral implants research* 2003, **14**(5):556-568.
3. Schwarz F, Ferrari D, Sager M, Herten M, Hartig B, Becker J: **Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects**. *Clinical oral implants research* 2009, **20**(11):1219-1230.
4. Freeman K, Ludington JR, Jr., Svec TA, Pinero GJ, Hoover J: **Continuously infused calcium hydroxide: its influence on hard tissue repair**. *Journal of endodontics* 1994, **20**(6):272-275.
5. Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M: **Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions**. *International endodontic journal* 2003, **36**(2):100-105.
6. Evanov C, Liewehr F, Buxton TB, Joyce AP: **Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37 degrees C and 46 degrees C**. *Journal of endodontics* 2004, **30**(9):653-657.
7. Charles P, Nathalie S, Carine D, Alexandru G: **[Calcium hydroxide and treatment of inflammatory inter-radicular bone resorption of non-vital deciduous molars]**. *Revue belge de medecine dentaire* 2004, **59**(3):163-169.
8. De Moor RJ, De Witte AM: **Periapical lesions accidentally filled with calcium hydroxide**. *International endodontic journal* 2002, **35**(11):946-958.
9. De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA: **Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions**. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2005, **99**(5):628-636.
10. Schwarz F, Stratul SI, Herten M, Beck B, Becker J, Sculean A: **Effect of an oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal) on healing of intrabony periodontal defects. A pilot study in dogs**. *Clinical oral investigations* 2006, **10**(1):29-34.
11. Kasai HF, Tsubuki M, Honda T: **Studies on high-energy collision-induced dissociation of endogenous cannabinoids: 2-arachidonoylglycerol and n-arachidonoylethanolamide in FAB-mass spectrometry**. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 2006, **22**(7):921-930.
12. Stratul SI, Schwarz F, Becker J, Willershausen B, Sculean A: **Healing of intrabony defects following treatment with an oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal). A controlled clinical study**. *Clinical oral investigations* 2006, **10**(1):55-60.
13. Stavropoulos A, Geenen C, Nyengaard JR, Karring T, Sculean A: **Oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal) used as an adjunct to guided bone regeneration: an experimental study in rats**. *Clinical oral implants research* 2007, **18**(6):761-767.

14. Busenlechner D, Tangl S, Mair B, Fugger G, Gruber R, Redl H, Watzek G: **Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model**. *Biomaterials* 2008, **29**(22):3195-3200.
15. Kasaj A, Willershausen B, Jewszyk N, Schmidt M: **Effect of an oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal) on human periodontal fibroblasts. An in vitro study**. *Eur J Med Res* 2007, **12**(6):268-272.
16. Kohal RJ, Hurzeler MB, Schneider SR, Riede UN, Caffesse RG: **The effect of a calcium hydroxide paste on wound healing and osseointegration of dental implants. A pilot study in beagle dogs**. *Clinical oral implants research* 1997, **8**(5):375-385.
17. Benninghoff A, Drenckhahn D: **Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1**, vol. 17. München: Elsevier Urban & Fischer; 2008.
18. Junqueira LC, José C: **Histologie**, vol. 6. Heidelberg: Springer; 2004.
19. Liebl O: **Knochenregeneration mit rhBMP-2 und unterschiedlichen Trägermaterialien -Biomechanische, fluoreszenzmorphometrische und radiomorphometrische Untersuchungen im Rattenmodell**. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg; 2004.
20. Kukoschke KG, Mayer H: **[The importance of protein growth factors for the local regulation of bone growth]**. *Dtsch Med Wochenschr* 1990, **115**(50):1921-1926.
21. Kubler NR: **[Osteoinduction and -reparation]**. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 1997, **1**(1):2-25.
22. Neff A, Pautke C, Horch H-H: **Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Traumatologie des Gesichtsschädels**, vol. 4. München: Elsevier Urban & Fischer 2007.
23. Shapiro F: **Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process**. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1988, **70**(7):1067-1081.
24. Kaderly RE: **Primary bone healing**. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1991, **6**(1):21-25.
25. Marsell R, Einhorn TA: **The biology of fracture healing**. *Injury* 2011, **42**(6):551-555.
26. Garrel T von GL: **Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking**. *Der Unfallchirurg* 1998, **101**:713-727.
27. JM R: **Knochenersatzmittel**. Frankfurt am Main: Johann Wolfgang Goethe-Universität,; 1989.
28. Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W: **Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits**. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1985, **3**(1):65-77.
29. Gross U, Struntz V: **The interface of various glasses and glass ceramics with a bony implantation bed**. *Journal of biomedical materials research* 1985, **19**:251-271.
30. Ducheyne P: **Bioglass coatings and bioglass composites as implant materials**. *Journal of biomedical materials research* 1985, **19**:273-291.
31. Lexer E: **Ueber freie Transplantation**. *Langenbecks Archiv für klinische Chirurgie* 1991, **95**:827-851.
32. Schweiberer L: **Experimentelle Untersuchungen von Knochentransplantaten mit unveränderter und mit denaturierter Knochengrundsubstanz**. *Hefte zur Unfallheilkunde* 1970, **103**:1-69.
33. Schweiberer L: **Der heutige Stand der Knochentransplantation**. *Chirurg* 1971, **42**:252-259.

34. Schweiberer L, Brauneisen R, Dambe L, Eitel F, Zwank L: **Derzeitiger Stand der auto-, hetero- und homoioplastischen Knochentransplantation. In: Implantate und Transplantate in der Plastischen- und Wiederherstellungs- chirurgie (eds. H. Cotta, A.K. Martini)**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1981.
35. Urist M: **Introduction to update on osteochondral allograft surgery. In Bone transplantation (eds. M. Aebi and P. Regazzoni)**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1989.
36. Kübler NR, Würzler K: **Bone morphogenetic proteins**. *Implantologie* 2002, **6**:177-192.
37. Schwenzer N, Ehrenfeld M: **Zahnärztliche Chirurgie. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde**, vol. 4. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2009.
38. Foitzik C, Merten H-A: **Knochenersatz- und Knochenaufbaumaterialien in der Implantologie und bei der Behandlung von Knochendefekten, in Restitutio ad integrum - Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau**. Balingen: Spitta Verlag; 2000.
39. Rueger JM: **Allogener Knochen und Knochenersatzmittel, in Unfallchirurgie**. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1995.
40. Grob D: **Autologous bone grafts: problems at the donator site, in Bone Transplantation**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1989.
41. Kloss FR, Neukam FW: **Rekonstruktive Knochenchirurgie. Methoden der letzten 15 Jahre**. *Zahnärztliche Implantologie* 1999, **15**:33-43.
42. Friedlaender GE: **Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions**. *Clinical orthopaedics and related research* 1983(174):58-68.
43. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA *et al*: **Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor**. *The New England journal of medicine* 1992, **326**(11):726-732.
44. Tugwell BD, Patel PR, Williams IT, Hedberg K, Chai F, Nainan OV, Thomas AR, Woll JE, Bell BP, Cieslak PR: **Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor**. *Annals of internal medicine* 2005, **143**(9):648-654.
45. Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW: **Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits**. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 1976, **58**(6):854-858.
46. Stevenson S, Shaffer JW, Goldberg VM: **The humoral response to vascular and nonvascular allografts of bone**. *Clinical orthopaedics and related research* 1996(326):86-95.
47. Spallek H, Deschner J: **Glossar der Grundbegriffe für die Praxis. Knochentransplantation und Implantation.** *Paradontol* 1995, **4**:331-336.
48. Becker W, Urist MR, Tucker LM, Becker BE, Ochsenbein C: **Human demineralized freeze-dried bone: inadequate induced bone formation in athymic mice. A preliminary report**. *Journal of periodontology* 1995, **66**(9):822-828.
49. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, DeLange RJ: **Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984, **81**(2):371-375.
50. Kübler NR: **Knochenregeneration durch Osteoinduktion**. *Deutsches Zahnärzteblatt* 1998, **253**:12.

51. Bauer TW, Muschler GF: **Bone graft materials. An overview of the basic science**. *Clinical orthopaedics and related research* 2000(371):10-27.
52. Wetzel AC, Stich H, Caffesse RG: **Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs**. *Clinical oral implants research* 1995, **6**(3):155-163.
53. Warnke PH, Springer IN, Acil Y, Julga G, Wiltfang J, Ludwig K, Russo PA, Sherry E, Sivananthan S, Hedderich J *et al*: **The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone**. *Biomaterials* 2006, **27**(7):1081-1087.
54. Terheyden H, Jepsen S, Vogeler S, Tucker M, Rueger DC: **Recombinant human osteogenic protein 1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier**. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 1997, **1**(5):272-275.
55. Misch CE, Dietsh F: **Bone-grafting materials in implant dentistry**. *Implant dentistry* 1993, **2**(3):158-167.
56. Hallman M, Thor A: **Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry**. *Periodontology 2000* 2008, **47**:172-192.
57. Osborn JF, Newesely H: **The material science of calcium phosphate ceramics**. *Biomaterials* 1980, **1**(2):108-111.
58. LeGeros RZ: **Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review**. *Advances in dental research* 1988, **2**(1):164-180.
59. Kasaj A, Willershausen B, Jepsen S: **Knochenersatzmaterialien in der regenerativen Parodontalchirurgie**. *Zahnmedizin up2date* 2010, **4(2)**:167-186.
60. Wehrhan F, Adam N, Prillwitz T, Holst S, Schlegel KA: **Knochenersatzmaterialien im klinischen Einsatz**

Möglichkeiten, Grenzen und biologischer Hintergrund. *ZWR - Das deutsche Zahnärzteblatt* 2009, **118 (12)**:622-630.
61. Rübsamen-Waigmann H: **Virussicherheit von Blutspenden und Knochentransplantaten, in Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren**. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1997.
62. Gürtler L: **Übertragbarkeit von Infektionserregern über allogene Knochentransplantate, in Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren**. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1997.
63. Wolf HF, Rateitschak K.H. : **Farbatlanten der Zahnmedizin 1 - Parodontologie**. In: *Farbatlanten der Zahnmedizin 1 - Parodontologie. Volume 3*, edn. Stuttgart: Thieme Verlag; 2004.
64. Ilizarov GA: **The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation**. *Clinical orthopaedics and related research* 1989(238):249-281.
65. Ilizarov GA: **The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction**. *Clinical orthopaedics and related research* 1989(239):263-285.
66. Ilizarov GA: **[Basic principles of transosseous compression and distraction osteosynthesis]**. *Ortopediia travmatologiia i protezirovanie* 1971, **32**(11):7-15.
67. McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH: **Lengthening the human mandible by gradual distraction**. *Plastic and reconstructive surgery* 1992, **89**(1):1-8; discussion 9-10.

68. McCarthy JG, Staffenberg DA, Wood RJ, Cutting CB, Grayson BH, Thorne CH: **Introduction of an intraoral bone-lengthening device**. *Plastic and reconstructive surgery* 1995, **96**(4):978-981.
69. Wangerin K: **[Distraction in mouth, jaw and facial surgery]**. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 2000, **4 Suppl 1**:S226-236.
70. Langer R, Vacanti JP: **Tissue engineering**. *Science* 1993, **260**(5110):920-926.
71. Bruder SP, Fox BS: **Tissue engineering of bone. Cell based strategies**. *Clinical orthopaedics and related research* 1999(367 Suppl):S68-83.
72. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL: **Bone tissue engineering: state of the art and future trends**. *Macromolecular bioscience* 2004, **4**(8):743-765.
73. Siqueira JF, Jr., Lopes HP: **Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review**. *International endodontic journal* 1999, **32**(5):361-369.
74. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ: **The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics**. *Australian dental journal* 2007, **52**(1 Suppl):S64-82.
75. Fava LR, Saunders WP: **Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications**. *International endodontic journal* 1999, **32**(4):257-282.
76. Roecher W, Hostert E, Dietz G, Bartholmes P: **Untersuchung typischer Knochenstoffwechselparameter von menschlischen Knochengewebe unter Einfluss von Kalziumhydroxidpräparaten**. University of Witten Herdecke; 1993.
77. Dietz G, Bartholmes P, Dietz G-Hj, Roecher W: **Calcium Hydroxide and Bone Regeneration. Odontological Aspects of Induced Osteogenesis in Experiment and Clinical Practice**. Munich: Byblos Verlag; 1998.
78. Stratul SI, Sculean A: **The Oily Calcium Hydroxyde Suspensions in Bone Regeneration**. *Timisoara Medical Journal* 2004, **2**.
79. Honig JF, Merten HA: **Subperiosteal versus epiperiosteal forehead augmentation with hydroxylapatite for aesthetic facial contouring: experimental animal investigation and clinical application**. *Aesthetic plastic surgery* 1993, **17**(2):93-98.
80. Beddoe AH: **A quantitative study of the structure of trabecular bone in man, rhesus monkey, beagle and miniature pig**. *Calcified tissue research* 1978, **25**(3):273-281.
81. Laiblin C, Jaeschke G: **[Clinical chemistry examinations of bone and muscle metabolism under stress in the Gottingen miniature pig--an experimental study]**. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 1979, **92**(6):124-128.
82. Eitel F, Klapp F, Jacobson W, Schweiberer L: **Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology**. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 1981, **99**(1):59-64.
83. Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ: **Swine as models in experimental surgery**. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* 1988, **1**(1):65-79.
84. Schlegel KA, Lang FJ, Donath K, Kulow JT, Wiltfang J: **The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials**. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2006, **102**(1):7-13.
85. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J: **Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research**. *Endocrinology* 1998, **139**(2):663-670.

86. Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A: **Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs**. *Calcified tissue international* 1987, **40**(6):318-322.
87. Mosekilde L: **Vertebral structure and strength in vivo and in vitro**. *Calcified tissue international* 1993, **53 Suppl 1**:S121-125; discussion S125-126.
88. Schlegel KA, Rupprecht S, Petrovic L, Honert C, Srour S, von Wilmowsky C, Felszegy E, Nkenke E, Lutz R: **Preclinical animal model for de novo bone formation in human maxillary sinus**. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009, **108**(3):e37-44.
89. Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hammerle CH: **Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate**. *Clinical oral implants research* 2008, **19**(2):188-195.
90. Schwarz F, Ferrari D, Podolsky L, Mihatovic I, Becker J: **Initial pattern of angiogenesis and bone formation following lateral ridge augmentation using rhPDGF and guided bone regeneration: an immunohistochemical study in dogs**. *Clinical oral implants research* 2010, **21**(1):90-99.
91. Hermann B: **Calcium hydroxid als Mittel zur Behandlung und Füllung von Wurzelkanälen**. Würzburg; 1920.
92. Holland R, de Mello W, Nery MJ, Bernabe PF, de Souza V: **Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide**. *Journal of endodontics* 1977, **3**(2):63-67.
93. Tepel J, Darwisch el Sawaf M, Hoppe W: **Reaction of inflamed periapical tissue to intracanal medicaments and root canal sealers**. *Endodontics & dental traumatology* 1994, **10**(5):233-238.
94. Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H: **Clonal expansion of hepatic stem/progenitor cells following flow cytometric cell sorting**. *Cell transplantation* 2001, **10**(4-5):393-396.
95. Takemoto RC, Fajardo M, Kirsch T, Egol KA: **Quantitative assessment of the bone morphogenetic protein expression from alternate bone graft harvesting sites**. *Journal of orthopaedic trauma* 2010, **24**(9):564-566.
96. Ito T, Shibukawa Y, Kawai H, Amano Y, Yamada S: **Effect of Bone Formation on Calcium Hydroxide Paste**. *Nippon Koku Inpuranto Gakkaishi* 2001, **14**:557-560.
97. Stratul SI, Sculean A, Willershausen B: **Intrabony Defects treated with a combination of alpha-TCP and an oily calcium hydroxyde Suspension. A case series**. *Timisoara Medical Journal* 2004, **54**:410-416.
98. Stavropoulos A, Windisch P, Szendroi-Kiss D, Gera I, Sculean A: **Histological evaluation of an oily-CaOH2 paste implantation in periodontal defects**. In. Barcelona; 2010.
99. Aparna S, Setty S, Thakur S: **Oily calcium hydroxide suspension in the treatment of infrabony periodontal defects: a randomized controlled clinical trial**. *Quintessence Int* 2011, **42**(10):835-842.
100. Amoian B, Haghanifar S, Vazinpour H, Bijani A: **CLINICAL AND RADIOGRAPHIC EVALUATION OF EFFECT OF OSTEORA ON CLASS II FURCATION DEFECTS IN CHRONIC PERIODONTITIS**. *Journal of Babol University Sciences* 2011, **59**:39-45.

101. Kasaj A, Willershausen B, Berakdar M, Tekyatan H, Sculean A: **Effect of an oily calcium hydroxide suspension on early wound healing after nonsurgical periodontal therapy**. *Clinical oral investigations* 2006, **10**(1):72-76.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 a: Konfiguration des Defektes in der Schweinetibia

Abbildung 1 b: Kontrollgruppe gefüllt mit Blut

Abbildung 1 c: Versuchsgruppe gefüllt mit Osteora

Abbildung 1 d: Repositionierter Knochendeckel

Abbildung 2: ROI (Range of Interest)

Abbildung 3 a: Versuchsgruppe nach einer Heilperiode von 4 Wochen

Abbildung 3 b: Kontrollgruppe nach einer Heilperiode von 4 Wochen

Abbildung 4 a: Versuchsgruppe nach einer Heilperiode von 8 Wochen

Abbildung 4 b: Kontrollgruppe nach einer Heilperiode von 8 Wochen

Abbildung 5: Residuelles OCHS umgeben von mineralisiertem Knochengewebe

Abbildung 6 a: Beide Gruppen zeigten eine gute Reintegration des Knochendeckels durch neu gebildeten trabekulären Knochen (Versuchsgruppe)

Abbildung 6 b: Exzessive Knochenneubildung um den Knochendeckel auf der zum Defekt abgewandten Seite in der Nähe der vorher angebrachten Osteosyntheseplatte (Versuchsgruppe)

Abbildung 6 c: Schnitt mit deutlich zu erkennenden nicht mineralisierten Defektspalten (Kontrollgruppe)

Graphik 1: Vergleich der Kontrollgruppe und Versuchsgruppe OCHS nach 4 Wochen in Bezug auf NMT und MT

Graphik 2: Vergleich der Kontrollgruppe und Versuchsgruppe OCHS nach 8 Wochen in Bezug auf NMT und MT

Graphik 3: Übersicht MT, NMT und residuelles OCHS in Prozent nach 4 und 8 Wochen (Versuchsgruppe)

Graphik 4: Übersicht MT und NMT in Prozent nach 4 und 8 Wochen (Kontrollgruppe)

Graphik 5: Residuelles OCHS in Prozent nach 4 und 8 Wochen

Graphik 6: Vergleich MT Kontrollgruppe versus Versuchsgruppe OCHS nach 4 und 8 Wochen

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren des Knochen

Tabelle 2: Phasen der sekundären Frakturheilung

Tabelle 3: Transplantationsterminologie

Tabelle 4: Vor- und Nachteile autologer Knochentransplantate

Tabelle 5: Vor- und Nachteile allogener Knochentransplantate

Tabelle 6: Vor- und Nachteile xenogener Knochentransplantate

Tabelle 7: Vor- und Nachteile alloplastischer Knochenersatzmaterialien

Tabelle 8: GBR-Membrantypen

Tabelle 9: Arten von Trägersubstanzen

Tabelle 10: Wirkung von OCHS auf die wichtigsten Parameter des Knochenstoffwechsels

Tabelle 11: Durchschnittliche Werte, Standartabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT, MT und OCHS in der Versuchsgruppegruppe sowie NMT und MT in der Kontrollgruppe nach 4 Wochen

Tabelle 12: Durchschnittliche Werte, Standartabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT, MT und OCHS in der Versuchsgruppe sowie NMT und MT in der Kontrollgruppe nach 8 Wochen

Tabelle 13: Durchschnittliche Werte, Standardabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT, MT und OCHS in der Versuchsgruppe

Tabelle 14: Durchschnittliche Werte, Standardabweichungen und Mediane (in Prozent) an NMT und MT in der Kontrollgruppe